

GEWINNUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON  
ANTIKÖRPERN GEGEN UNTEREINHEITEN DES  
KOMPLEX III AUS RINDERHERZMITOCHONDRIEN

SEBASTIAN STEER

1986

*Diss  
München*



Aus dem Institut für Physikalische Biochemie  
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. E. M. Klingenberg

**GEWINNUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON ANTIKÖRPERN  
GEGEN UNTEREINHEITEN DES KOMPLEX III  
AUS RINDERHERZMITOCHONDRIEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde  
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Sebastian Steer  
aus Höhenberg  
im Jahre 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|                                         |                             |
|-----------------------------------------|-----------------------------|
| Berichterstatter:                       | Prof. Dr. G. von Jagow      |
| Mitberichterstatter:                    | Prof. Dr. E. M. Klingenberg |
| Dekan:                                  | Prof. Dr. W. Spann          |
| Tag der mündlichen Prüfung: 15. 5. 1986 |                             |

Mein Vater, der ich, der ich mich lange Zeit der  
Hochachtung der Tugend und der Wissenschaft  
bewusst war, die ich in einem kleinen Kreis  
der Arbeit gefunden habe.

Der Herr, der ich mich lange Zeit der

Hochachtung der Tugend und der Wissenschaft

bewusst war, die ich in einem kleinen Kreis

der Arbeit gefunden habe.

Meinen Eltern

gewidmet



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554808\\_0093](https://archive.org/details/IA41554808_0093)

Herrn Prof. Dr. G. von Jagow danke ich für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen, die im wesentlichen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei allen Mitarbeitern unseres Arbeitskreises möchte ich mich sehr herzlich für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bedanken, besonders bei Herrn Thomas Link, Herrn Dr.H. Schägger und Herrn Ulrich Brandt.



# INHALTSVERZEICHNIS

|       |                                                                   |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1.    | Einleitung                                                        | 1  |
| 1.1   | Allgemeines                                                       | 1  |
| 1.2   | Funktion des Komplex III                                          | 3  |
| 1.3   | Struktur des Komplex III                                          | 5  |
| 1.4   | Zielsetzung                                                       | 6  |
| 2.    | Methoden                                                          | 7  |
| 2.1   | Präparative Methoden                                              | 7  |
| 2.1.1 | Präparation von Rinderherzmitochondrien                           | 7  |
| 2.1.2 | Präparation des Komplex III                                       | 8  |
| 2.1.3 | Einbau des Komplex III in Phospholipidvesikel                     | 11 |
| 2.1.4 | Präparation der Untereinheiten des Komplex III                    | 12 |
| 2.1.5 | SDS Polyacryamid Gelelektrophorese                                | 17 |
| 2.2   | Funktionelle Tests                                                | 19 |
| 2.2.1 | Aktivitätstest                                                    | 19 |
| 2.2.2 | Reduzierbarkeit des Cytochrom b des Komplex III                   | 19 |
| 2.2.3 | Reduzierbarkeit des Cytochrom c <sub>1</sub> mit Ferrocytochrom c | 20 |
| 3.    | Ergebnisse                                                        | 22 |
| 3.1   | Komplex III und seine Untereinheiten                              | 22 |
| 3.2   | Immunisierung, Produktion von Antikörpern                         | 24 |
| 3.3   | Reinigung von Immunglobulinen                                     | 27 |
| 3.4   | Charakterisierung der Immunglobuline IgG                          | 29 |
| 3.5   | Immunoblotting                                                    | 31 |
| 3.5.1 | Elektrophoretischer Transfer (mit Transferbedingungen)            | 31 |
| 3.5.2 | Inkubation des Trägermaterials mit Antiseren                      | 38 |

|      |                                                                                     |    |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6  | Spezifität der Antiseren im Immunoblotting                                          | 40 |
| 3.7  | Bestimmung der Titer der Antiseren im ELISA                                         | 44 |
| 3.8  | Hemmung der katalytischen Aktivität durch<br>Antikörperbindung                      | 48 |
| 3.9  | Effekt der Antikörper auf die Zugänglichkeit<br>des äußeren Chinonreaktionszentrums | 51 |
| 3.10 | Effekt der Antikörper auf die Cytochrom c<br>Bindungsstelle                         | 51 |
| 4.   | Diskussion                                                                          | 54 |
| 5.   | Zusammenfassung                                                                     | 64 |
| 6.   | Literaturverzeichnis                                                                | 66 |
| 7.   | Abkürzungen                                                                         | 70 |

## 1. Einleitung

### 1.1 Allgemeines

Die wichtigste Energiequelle für alle in lebenden Organismen vorkommenden endergonischen Prozesse ist die Energie der Phosphorsäureanhydrid-Bindung der Nukleosidtriphosphate, speziell des Adenosintriphosphats (ATP). In aeroben Organismen, zum Beispiel Säugetieren, wird mehr als 90 % des ATP in einem oxidativen Phosphorylierung genannten Vorgang gebildet. Dieses System der oxydativen Phosphorylierung ist in der inneren Membran des Mitochondriums lokalisiert und besteht aus einer Elektronentransportkette, der Atmungskette, sowie der ATP - Synthetase.

Anfang der sechziger Jahre gelang es den Gruppen von Y. Hatefi und J. S. Rieske, aus der inneren Membran von Rinderherzmitochondrien vier Multiproteinkomplexe (Komplex I - IV) zu isolieren und diese in Verbindung mit den beiden Molekülen Ubichinon und Cytochrom c als Atmungskette zu charakterisieren (Übersicht bei Hatefi und Galante, 1978). Durch dieses System von Enzymkomplexen werden die vor allem im Citratzyklus und bei der Fettsäureoxidation gewonnenen Redoxäquivalente (NADH) über mehrere Zwischenstufen auf Sauerstoff unter Bildung von Wasser übertragen. Für die Zelle nutzbar wird die Energie dieser stark exergonischen Reaktion dadurch, daß der Elektronentransport mit einem vektoriellen Protonentransport über die Membran gekoppelt ist. Der dadurch gebildete Protonengradient kann von der ATP - Synthetase zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt werden. Komplex I, III, IV, ihre Substrate sowie die ATP - Synthase sind aus Abbildung 1 ersichtlich.

# Blockschema der Struktur und Funktion der Atmungskette

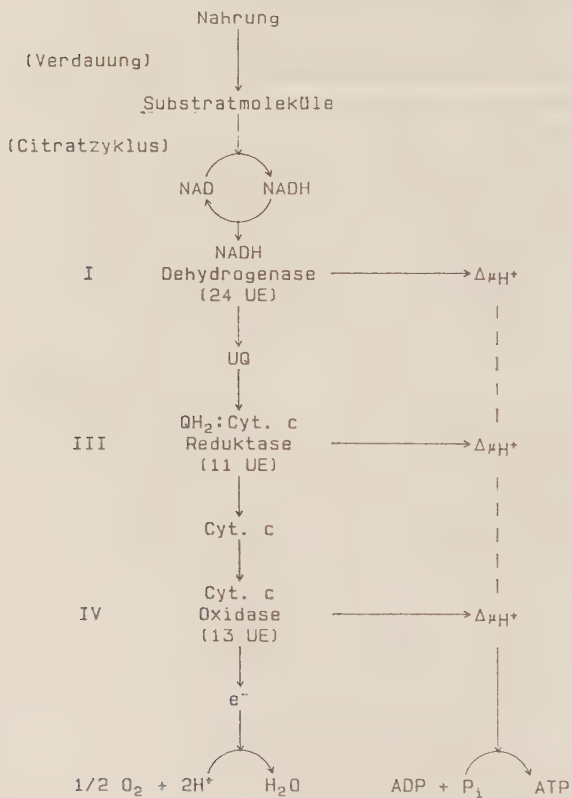


Abbildung 1: Blockschema der Struktur und Funktion der Atmungskette

## 1.2 Funktion des Komplex III

Der Komplex III, der zentrale Enzymkomplex der mitochondrialen Atmungskette, katalysiert den Elektronentransfer von Ubihydrochinon-10 oder seinen Homologen auf Cytochrom c. Der Elektronendonator Ubihydrochinon, der in der Phospholipiddoppelschicht der Mitochondrienmembran lokalisiert ist und in ca. 10 fachem Überschuß zu Cytochrom c<sub>1</sub> vorliegt, hat die Funktion eines Redoxpools. Das Ubichinon überträgt die Redoxäquivalente von den verschiedenen Dehydrogenasen auf die Cytochrome der Atmungskette (Kröger und Klingenberg, 1970). Gleichzeitig erfolgt mit dem Elektronenfluß ein Protonentransport über die Membran. Dabei werden pro transportiertem Elektron zwei Protonen von der Matrixseite auf die Cytoplasmaseite der mitochondrialen Innenmembran übertragen. Der Elektronentransport läßt sich *in vitro* sowohl am isolierten Komplex III als auch an Phospholipidvesikeln mit inkorporiertem Komplex durch Zugabe der entsprechenden Reaktionspartner, d.h. Ubihydrochinon und Cytochrom c, nachvollziehen.

Für den Reaktionsablauf werden zur Zeit hauptsächlich zwei Modelle diskutiert: Während der von Wikström vorgeschlagene Cytochrom b-Zyklus (Wikström et al., 1981) sich im wesentlichen auf den Mechanismus der Elektronenübertragung beschränkt, versucht Mitchell in seinem Modell eines "Q-cycle" sowohl den Elektronen- als auch den Protonentransport zu erklären (Mitchell, 1976). Ein Modell eines modifizierten "Q-cycle" sei für die vorliegende Arbeit kurz dargestellt (von Jagow und Link, 1984).

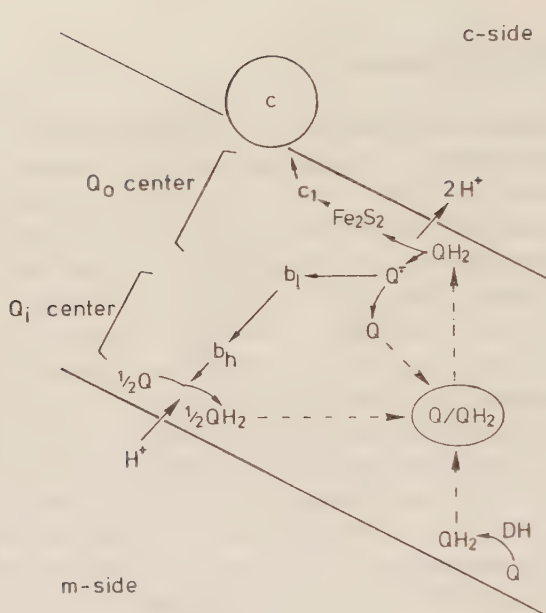


Abbildung 2: Schema des Elektronenflusses im Komplex III nach von Jagow und Link (1984)

An der cytosolischen Seite der Membran befindet sich das Ubichinonoxidationszentrum des Komplexes, das im wesentlichen von dem  $b_{566}$ -Zentrum des Cytochrom b und dem Eisenschwefelprotein ( $Fe_2S_2$ ) gebildet wird ( $Q_o$ -Zentrum). Die dort ablaufende Oxidation des Ubihydrochinons findet in zwei Schritten statt. In einem ersten Schritt wird ein Elektron von  $QH_2$  auf das  $Fe_2S_2$ -Protein und von dort über das an der Außenseite lokalisierte Cytochrom  $c_1$  auf den Reaktionspartner Cytochrom c übertragen. Dabei werden an der Außenseite zwei Protonen freigesetzt. Das entstandene Semichinon gibt in einem zweiten Schritt sein Elektron an das  $b_{566}$ -

Zentrum des Cytochrom b ab. Über das tiefer in der Membran gelegene  $b_{562}$ -Zentrum gelangt dieses Elektron zur Matrix-seite und fließt dort unter Aufnahme eines Protons zurück auf Ubichinon (Ubichinonreduktionszentrum,  $Q_1$ -Zentrum). Pro Umlauf wird also nur ein Elektron auf Cytochrom c übertragen, während das zweite Elektron über eine Art Seitenweg zurückfließt und dem Ubichinonpool erneut zur Verfügung steht. Es handelt sich also um einen zyklischen Elektronentransport, der eine  $2H^+/e^-$  Stöchiometrie ermöglicht.

### 1.3 Struktur des Komplex III

Die von Engel et al. (1983) beschriebene Isolierung von Komplex III aus Rinderherzmitochondrien liefert eine reine Form des Enzyms, frei von Succinatdehydrogenase und anderen Cytochromen. Wenn der Komplex durch Triton X-100 in Lösung gehalten wird, liegt er monodispers in Form von Dimeren (Molekulargewicht ca. 500 000) vor (von Jagow et al., 1977). Der Dimer besteht aus 2 mal 11 Untereinheiten. Im Gegensatz dazu bestehen die bc Komplexe der aeroben Bakterien und der Chloroplasten der Pflanzen aus weniger Untereinheiten (G. Hauska et al., 1983). Allen diesen Komplexen ist jedoch gemeinsam, daß lediglich drei ihrer Untereinheiten mit Redoxzentren ausgestattet sind: Cytochrom b, das zwei Häm b-Zentren trägt, Cytochrom  $c_1$  mit einem Hämzentrum und ein Eisenschwefelprotein mit einem Ferredoxintyp- $Fe_2S_2$ -Zentrum.

Über die Funktion der beiden großen "Core"- Proteine und die kleinen Untereinheiten ist wenig bekannt; das 13.4 kDa Protein wurde von Yu et al. (1978) als Q-bindendes Protein 'QP-C' beschrieben; das 9.2 kDa Protein, das zusammen mit dem Cytochrom  $c_1$  und dem 7.2 kDa Protein den " $c_1$  Subkomplex" bildet, wird von Wakabayashi et al. (1982) als "hinge"- (= Scharnier-) Protein bezeichnet und für die Wechselwirkung zwischen Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom c verantwortlich ge-

macht. Alle kleinen Proteine scheinen Membranproteine zu sein, d.h. mindestens einen Membrananker zu besitzen (von Jagow et al., 1985).

Die Untereinheiten des Komplex III aus Rinderherz konnten alle einzeln isoliert und mit Ausnahme der beiden Core Proteine und des Eisenschwefelproteins sequenziert werden (siehe bei Schägger et al., 1986).

#### **1.4 Zielsetzung**

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, spezifische Antikörper gegen Komplex III und dessen Proteinuntereinheiten zu gewinnen und in reiner Form zu isolieren. Dazu sollten Kaninchen gegen die isolierten Proteine immunisiert werden. Die Antikörper sollten aus den gewonnenen Antiseren isoliert und danach mittels gängiger immunologischer Methoden (Immunoblotting, Mikrotiterassay) charakterisiert werden. Der Einfluß verschiedener Antikörper auf die enzymatische Aktivität des Komplex III sollte untersucht werden. Mittels der Antikörper (gegen einzelne Untereinheiten) soll eine strukturelle und funktionelle Differenzierung der kleinen Untereinheiten vorgenommen werden.

## 2. Methoden

### 2.1 Präparative Methoden

#### 2.1.1 Präparation von Rinderherzmitochondrien (Smith, 1967)

|              |        |         |        |
|--------------|--------|---------|--------|
| Waschmedium: | 250 mM | Sucrose |        |
|              | 2 mM   | EGTA    | pH 7,2 |

|                     |            |         |        |
|---------------------|------------|---------|--------|
| Präparationsmedium: | 250 mM     | Sucrose |        |
|                     | 10 mM      | Tris    |        |
|                     | 50 $\mu$ M | EDTA    | pH 7,2 |

Das Rinderherz wird von Sehnen und Fett befreit, zerstückelt, im Waschmedium gewaschen und mit einem Fleischwolf zerkleinert. Zu jeweils 500 g Fleisch werden 10 ml Tris (1 M) und 1 ml PMSF (0,1 M) zugeben und mit Präparationsmedium auf 1,5 l aufgefüllt. Der Aufschluß der Zellen erfolgt mit Hilfe eines Mixers. Bei Abweichung von pH 7.2 wird mit Tris (1 M) korrigiert. Größere Gewebsreste und Zelltrümmer werden durch Zentrifugation (1600 g) und anschließende Filterung durch vierlagige Gazetücher abgetrennt. Nach einer Zentrifugation (9000 g) wird das Sediment in Präparationsmedium aufgenommen und gepottet. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1600 g wird das Sediment verworfen. Die Mitochondrien werden aus dem Überstand abzentrifugiert (9000 g) und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

## 2.1.2 Komplex III Präparation

Komplex III wurde in Triton X-100 (Serva) nach der Methode von Engel et al. (1980) isoliert. Alle Arbeitsschritte wurden im Eisbad oder im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

### Vorextraktion:

Von den in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Mitochondrien werden etwa 9 g aufgetaut und 10 Minuten in einem Sorvall SS-34 Rotor bei 18000 rpm (27000 g) zentrifugiert. Das Sediment wird in wenig Puffer 1 (siehe Tabelle 1) aufgenommen und durch mehrfaches Pottern homogenisiert. Anschließend ermittelt man mit Hilfe eines Redoxdifferenzspektrums den Cytochrom b-Gehalt der Mitochondriensuspension. Dazu wird die Probe mit Natrium-Dithionit reduziert bzw. mit Ferricyanid (Kalium-Hexacyanoferrat III) oxidiert und das Differenzspektrum im Bereich von 640 nm bis 530 nm aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit den bei Riccio et al. (1977) angegebenen Absorptionskoeffizienten. Mit Puffer 1 stellt man auf eine Cytochrom b-Konzentration von 17,5  $\mu\text{M}$  ein und erreicht damit einen Proteingehalt von etwa 35 mg/ml, da der Cytochrom b - Gehalt der Rinderherzmitochondrien erfahrungsgemäß bei 0.5 nMol Cyt.b / mg Protein liegt. Dieser Mitochondriensuspension werden 11,6 Vol% einer 20 %igen Triton X-100-Lösung sowie 20 Vol% einer 4 M NaCl-Lösung zugegeben, was Endkonzentrationen von 1,75 % Triton und 600 mM NaCl ergibt. Bei dieser Tritonkonzentration werden mitochondriale Matrixproteine sowie einige periphere Membranproteine wie z.B. Cytochrom c abgetrennt, während der Komplex III in der Membran erhalten bleibt. Nach 5 Minuten Rühren im Eisbad wird bei 100 000 g abzentrifugiert.

### **Hauptextraktion:**

Der Überstand wird verworfen, das Pellet in Puffer 2 aufgenommen und wieder durch Pottern homogenisiert. Nach Einstellen auf eine Cytochrom b-Konzentration von  $28 \mu\text{M}$  (entsprechend ungefähr  $35 \text{ mg/ml}$  Protein) mit Puffer 2 wird ein gleich großes Volumen Puffer 3 zugegeben. Dadurch erreicht man eine Endkonzentration von  $2 \%$  Triton X-100 und solubilisiert damit den Komplex III. Nach der anschließenden Zentrifugation ( $100\,000 \text{ g}$ ,  $45 \text{ Min.}$ ) befindet sich der Komplex III in gelöster Form im Überstand.

### **Hydroxyapatit-Chromatographie:**

Um zu vermeiden, daß das zu isolierende Protein zu lange hohen Detergens- und Salzkonzentrationen ausgesetzt und damit zum Teil inaktiviert bzw. denaturiert wird, erfolgt die Bindung des Komplex III an Hydroxyapatit im Batch-Verfahren: Der rotbraune Überstand aus der Hauptextraktion wird in ein gleich großes Volumen Hydroxyapatit, das vorher mit 2 Volumina Puffer 4 äquilibriert wurde, eingerührt. Nach niedertouriger Zentrifugation ( $300 \text{ rpm}$  in einem Sorvall GS 3 Rotor,  $2 \text{ Min.}$ ) schlämmt man das Säulenmaterial in 4- bis 5-fachem Volumen Puffer 5 (Waschpuffer) auf und zentrifugiert erneut niedertourig ab. Das Sediment wird in Puffer 5 aufgenommen, in eine Säule gepackt und nochmals mit halbem Säulenvolumen Puffer 5 gespült. Die Elution des Komplex III erfolgt mit Puffer 6.

### **Gelchromatographie:**

Die Komplex III-haltigen Fraktionen werden vereinigt, durch Druckfiltration an einer Amicon YM 100 Membran auf eine Proteinkonzentration von ca.  $20 \text{ mg/ml}$  konzentriert und durch Gelfiltration auf einer Sepharose CL-6B Säule (äquilibriert mit Puffer 7) von Cytochrom-Oxidase und weiteren Proteinverunreinigungen abgetrennt. Der so isolierte Komplex III wird in  $50 \text{ Gew.}\%$  Glycerin bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

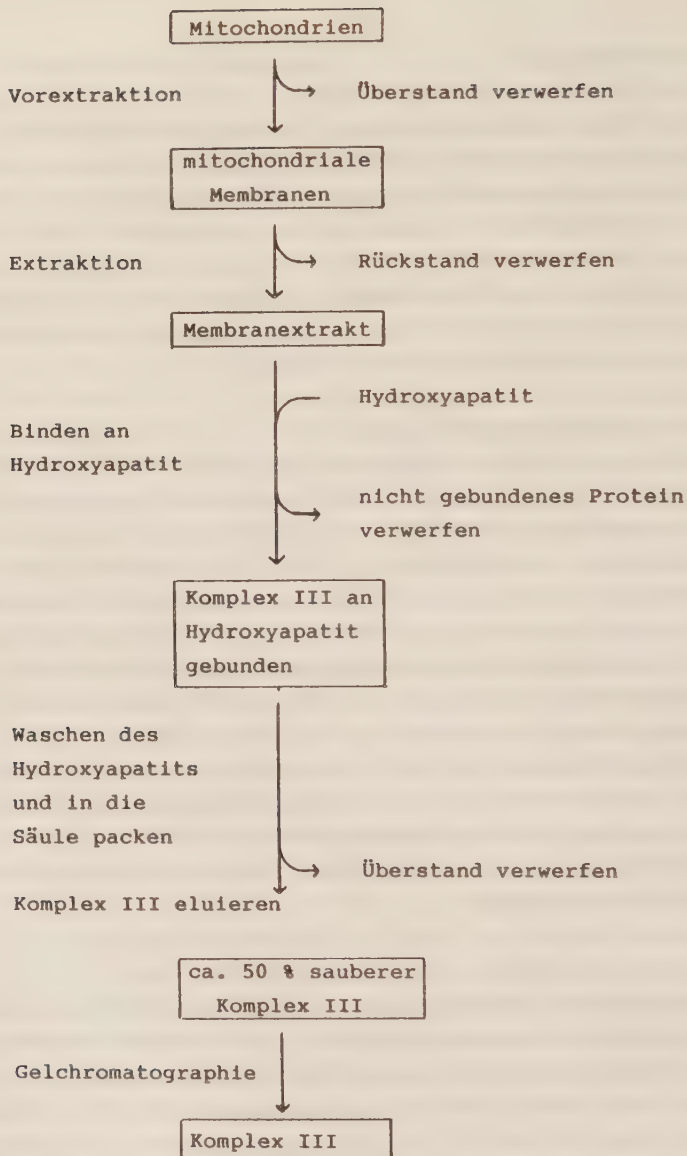


Abbildung 3: Schema der Präparation des Komplex III (nach Engel et al., 1980)

**Tabelle 1: Puffer für die Präparation des Komplex III von Rinderherzmitochondrien**

Alle Puffer sind pH 7.2 eingestellt und enthalten 1 mM Natriumazid

|                  | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Triton X-100 (%) | -    | -    | 4.0  | 0.5  | 0.05 | 0.25 | 0.05 |
| Na-Chlorid (M)   | -    | -    | 1.2  | 0.25 | 0.25 | -    | 0.1  |
| Na-Phosphat (M)  | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.08 | 0.1  | -    | 0.02 |
| K-Phosphat (M)   | -    | -    | -    | -    | -    | 0.2  | -    |
| Sucrose (M)      | -    | 0.3  | 0.3  | -    | -    | -    | -    |

**2.1.3 Einbau des isolierten Komplex III in Phospholipid-vesikel**

Der Einbau des isolierten Komplex III in Phospholipid-vesikel erfolgte nach der Methode von Engel (1983). Eipholipid wurde aus Hühnerei nach der von Krämer und Klingenberg (1980) verbesserten Methode von Wells und Hanahan (1969) hergestellt.

**Dialysepuffer:**

20 mM K-MOPS

100 mM Kaliumchlorid

2 mM Natriumazid

pH 7.2 mit Kaliumhydroxid  
eingestellt

**Cholatstammlösung:**

500 mM Kaliumcholat

2 mM Natriumazid

pH 7 bis 8

260 mg Eipholipid und 0.6 ml der Cholatstammlösung werden in 6 ml Dialysepuffer durch Beschallen im Eisbad gelöst. Dieser Ansatz wird mit 180 nMol Komplex III in ca. 7 ml 50 % (w/v) Glycerin vermischt und zweimal für je 2 h und anschließend über Nacht gegen Dialysepuffer im 50- bis 100-fachen Volumenüberschuß dialysiert. Nach wiederholter Dialyse ist die so erhaltene Vesikelpräparation ca. 7  $\mu$ m an Komplex III. In einer nach dieser Vorschrift hergestellten Vesikelpräparation sind über 90 % des Komplexes mit der Reaktionsstelle für Cytochrom c nach außen gerichtet eingebaut (von Jagow, nicht publiziert), d.h. in der gleichen Orientierung wie in der inneren Mitochondrienmembran.

#### **2.1.4 Präparation der Proteinuntereinheiten des Komplex III**

Die Präparation der Untereinheiten erfolgte nach der Methode von Schagger et al. (1986). Da für immunologische Methoden die Oberflächenstruktur eines Proteins eine große Rolle spielt, wurde besonderer Wert darauf gelegt, die einzelnen Proteine in möglichst nativer Form ohne starke Denaturierung zu isolieren. Konformationsänderungen unterschiedlichen Ausmaßes werden dabei jedoch immer stattfinden. Nachreinigung oder Lösung in SDS wurde vermieden.

##### **Präparation des $\text{Fe}_2\text{S}_2$ -Proteins und des 6,4 kDa-Proteins:**

Die Lösung von 100 mg eines frisch präparierten Komplex III in 100 mM NaCl, 35 mM Natriumphosphat, 10 mM MOPS, 0.05% Triton X-100 wird auf eine 100 ml Hydroxyapatit-Säule, äquilibriert mit Puffer 1 (siehe Tabelle 2), aufgetragen. Nach einem Waschvorgang mit 50ml des Äquilibrierungspuffers 1 werden das 6.4 kDa Protein und das  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ -Protein durch aufeinanderfolgende Anwendung von 50 ml Puffer 2 und 50 ml Puffer 3 vom Komplex III abgespalten und von der Hydroxy-

apatitsäule eluiert. Nach dem Puffer 3 folgt wieder der Waschpuffer 1. Die eluierten Proteinfraktionen werden über eine Sephadex G-25 Säule, äquibriert mit Puffer 4, entsalzt. Um beide Fraktionen zu konzentrieren und von Tritonüberschüssen zu befreien, werden die Proteine mit 50% Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  präzipitiert. Um eine Acetonfällung zu vermeiden, kann das Eisenschwefelprotein alternativ dazu durch Ausfrieren aus der Harnstofflösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt werden. An Hydroxyapatit gebunden bleibt der sogenannte  $\text{bc}_1$  Subkomplex.

**Spaltung des  $\text{bc}_1$  Subkomplexes** in eine Fraktion, die 6 Proteine enthält, und in einen Cytochrom  $\text{c}_1$  Subkomplex, der aus 3 Proteinen besteht:

Der  $\text{bc}_1$  Subkomplex wird durch Puffer 5 (ein Säulenvolumen) gespalten. 6 der insgesamt 9 Proteinuntereinheiten des  $\text{bc}_1$  Subkomplexes werden durch den Spaltungspuffer eluiert (Eluat 1). Nur der Cytochrom  $\text{c}_1$  Subkomplex bleibt auf der Säule gebunden und wird mit 100 ml Puffer 6 gewaschen. Die Elution des Cytochrom  $\text{c}_1$  Subkomplexes erfolgt mit Puffer 7 bei Raumtemperatur (Eluat 2).

### **Präparation des Cytochrom $\text{c}_1$ :**

Das Eluat 2 wird bei  $4^{\circ}\text{C}$  gegen 10 mM MOPS, pH 7.2, dialysiert und durch Druckfiltration an einer Amicon PM 10 Membran auf ein Volumen von 5 ml konzentriert. Die Probe wird dann mit 5 ml Puffer 8 verdünnt und auf eine 10 ml Hydroxyapatit-Säule, die mit Puffer 6 äquibriert ist, aufgetragen. Das Häm-tragende Cytochrom  $\text{c}_1$  bindet unter diesen Bedingungen nicht an Hydroxyapatit. Anschließend werden der Reihe nach je 10 ml Puffer 9, 10 und 11 angewendet. Die beiden Proteine mit Molekulargewicht 9.2 kDa und 7.2 kDa werden damit abgetrennt. Das Cytochrom  $\text{c}_1$  wird über Sephadex G-25 von Guanidin befreit. Es liegt in aggregierter Form vor und kann durch Zentrifugation bei 10 000 g sedimentiert werden.

### **Präparation des Cytochrom b und des 13.4 kDa Proteins:**

Das oben beschriebene Eluat 1 wird mit Hilfe einer 250 ml Sephadex G-25 Säule, die mit Puffer 12 äquilibriert ist, von Guanidin abgetrennt. Die Probe wird dann auf eine 30 ml Hydroxyapatit-Säule, äquilibriert mit Puffer 9, aufgetragen und mit 30 ml Puffer 12 gewaschen. Mehr als 60% des Cytochrom b und fast 100% des 13.4 kDa und des 8 kDa Proteins passieren dabei die Säule ungebunden, während die Core Proteine, das 9.5 kDa Protein und der Rest des Cytochrom b auf der Hydroxyapatitsäule gebunden bleiben. Der Durchlauf wird durch Druckfiltration (Amicon YM 5 Membran) um den Faktor 10 konzentriert und auf eine 600 ml Sephadex G-50 sf Säule, äquilibriert mit Puffer 13, aufgetragen. Die Gel-filtration führt zu einer Abtrennung des 8 kDa Proteins. Die Cytochrom b/13.4 kDa Fraktionen werden gesammelt und druck-filtriert (Amicon YM5 Membran). Die Tritonkonzentration, gemessen bei 280 nm ( $\epsilon_{1\%} = 23.4$ ), soll dabei 5 % nicht übersteigen. Eine abschließende Gelfiltration mit einer 600 ml Sephadex G-200 Säule, äquilibriert mit Puffer 12, führt zu einer Trennung von Cytochrom b und 13.4 kDa Protein. Das Cytochrom b kann nach einer erneuten Druck-filtration zur Immunisierung eingesetzt werden. Das 13.4 kDa Protein liegt dagegen in einer hohen Tritonkonzentration vor, was die direkte Verwendung zur Immunisierung verbietet. Eine Ausfällung des Proteins ist weder mit Trichloressig-säure, noch mit Aceton, noch mit einer Kombination beider Reagentien möglich. Deshalb wird das 13.4 kDa Protein nach Erniedrigung der Salzkonzentration auf 50 mM NaCl an eine Hydroxyapatitsäule gebunden (2 mg Protein / ml Hydroxy-apatit). Die Elution des Proteins erfolgt mit Puffer 6, wodurch ein wesentlich niedrigeres Triton : Protein-Ver-hältnis erreicht wird.

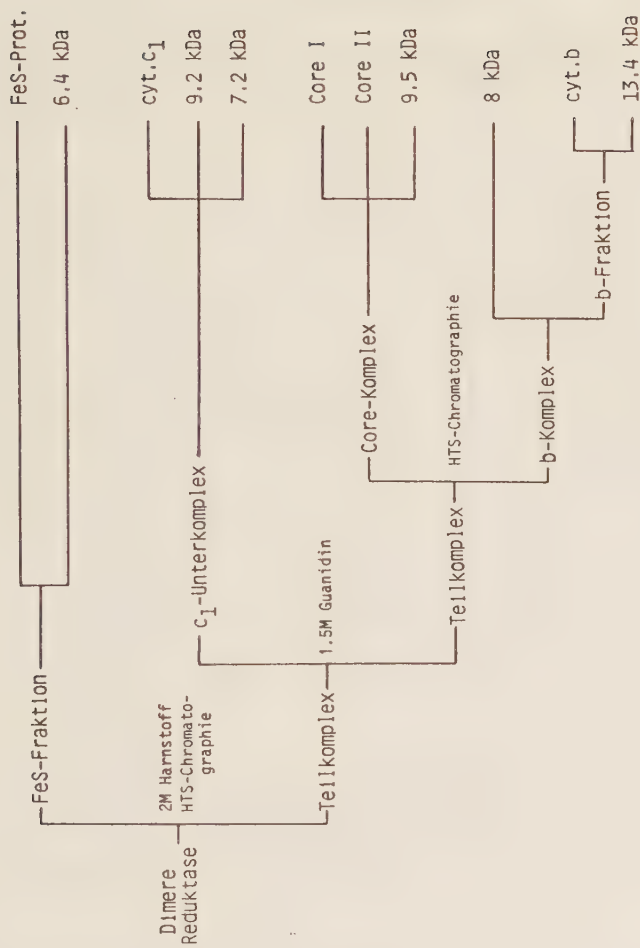


Abbildung 4: Schema der Präparation der Proteinuntereinheiten des Komplex III



### **2.1.5 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Die Darstellung der 11 Untereinheiten des Komplex III erfolgte mit Hilfe der von Schägger (1986) beschriebenen SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese.

#### **Gelpräparation:**

Die für die Gelelektrophorese hergestellten Stammlösungen sind in Tabelle 3 dargestellt. Sie werden mit Ausnahme der Acrylamid-Bisacrylamid Mischung, die bei 4°C gelagert wird, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Polymerisation des Trenngels (Tabelle 4) wird durch Zugabe von 100 µl 10% Ammoniumsulfat und 10 µl TEMED eingeleitet. Um eine glatte Oberfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten, wird das Trenngel vor Ablauf der Polymerisation mit Überschichtungspuffer bedeckt. Nach erfolgter Polymerisation (Dauer ca. 15 Min.) wird der Überschichtungspuffer abgegossen und durch das Sammelgel (Tabelle 4), das durch Zugabe von 50 µl Ammoniumsulfat (10%) und 5 µl TEMED polymerisiert wird, ersetzt. Ein Kamm mit Platzhalter für 16 Probenaufträge wird in das noch nicht polymerisierte Sammelgel eingeschoben, bis dieser ca. 1 cm vom Trenngel entfernt ist.

#### **Probenvorbereitung:**

Die Proteinproben werden in einem Puffer mit den folgenden Endkonzentrationen inkubiert: 5 % SDS, 15 % Glycerin, 50 mM Tris, 2 % Mercaptoethanol, 0.003 % Bromphenolblau, pH 6.8, eingestellt mit HCl.

#### **Elektrophoresebedingungen:**

Verwendet werden Plattengele (14 x 14 x 0.15 cm) in einer vertikalen Apparatur. Die Elektrophorese wird bei Raumtemperatur für 2 Stunden bei 30 V und anschließend für 16 Stunden bei konstant 90 V durchgeführt.

### Färbung:

Nach Fixieren der Proteine für 3 Stunden in einer Lösung, bestehend aus 50 % Methanol und 10 % Essigsäure, wird das Gel für 3 Stunden in einer Lösung, die 10 % Essigsäure und 0.1 % Coomassie Brilliant Blue G-250 enthält, gefärbt.

**Tabelle 3: Stammlösungen für die SDS Gelelektrophorese**

| Puffer                | Tris<br>(M) | Tricine<br>(M) | HCl<br>(M) | SDS<br>(%) |
|-----------------------|-------------|----------------|------------|------------|
| Anodenpuffer          | 0.2         | -              | -*         | -          |
| Kathodenpuffer        | 0.1         | 0.1            | -          | 0.1        |
| Gelpuffer             | 3.0         | -              | 1.0        | 0.3        |
| Überschichtungspuffer | 1.0         | -              | 0.33       | 0.1        |

Acrylamid-Bisacrylamid Mischung: 48 % Acrylamid (w/v)  
1.5 % Bisacrylamid (w/v)

\* mit HCl auf pH 8.9 eingestellt

**Tabelle 4: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel**

|                        | 16 % Trenngel |          | 4 % Sammelgel |
|------------------------|---------------|----------|---------------|
|                        | 0.15 cm       | 0.075 cm |               |
| Acrylamid-Bisacrylamid | 20 ml         | 10 ml    | 1 ml          |
| Gelpuffer              | 20 ml         | 10 ml    | 3 ml          |
| Glycerin               | 8 ml          | 4 ml     | -             |
| Bidest                 | ad 60 ml      | ad 30 ml | ad 12 ml      |

## 2.2 Funktionelle Tests

### 2.2.1 Aktivitätstest

Die Ubihydrochinon-Cytochrom c Reduktase Aktivität des isolierten Komplex III wird über die Cytochrom c Reduktion bestimmt. Gemessen wird die Extinktionsänderung der Probenlösung bei 549,5 nm gegen 540 nm als Referenzwellenlänge in einem Shimadzu UV-300 Photometer im Zweiwellenlängenbetrieb in einer Meßküvette. Um eine zeitliche Auflösung der Extinktionsänderung zu ermöglichen, muß der Komplex III in sehr niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden. Cytochrom c wird im Meßpuffer 50  $\mu\text{M}$  vorgelegt. Unmittelbar vor dem Test wird ein synthetisch hergestelltes Nonylubihydrochinon (Träglar, 1985) zugegeben. Die Reduktion des Ubichinons erfolgt mit Dithionit. Gestartet wird der Test durch Zugabe von Komplex III (Endkonzentration 15 nM). Die Messungen werden bei 25°C und pH 7.2 durchgeführt. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom c beträgt 19 ( $10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$ ).

|            |                          |        |
|------------|--------------------------|--------|
| Meßpuffer: | 250 mM Sucrose           |        |
|            | 50 mM Kaliumphosphat     |        |
|            | 0.2 mM EDTA              |        |
|            | 2 mM Natriumazid         |        |
|            | 0.1 % Rinderserumalbumin | pH 7.2 |

### 2.2.2 Reduzierbarkeit des Cytochrom b des Komplex III

Die Reduzierbarkeit des Cytochrom b mit Nonylhhydrochinon wird durch Absorptionsdifferenzspektren im Zweistrahilverfahren gemessen. Komplex III wird mit Meßpuffer zu einer Konzentration von 0.1  $\mu\text{M}$  verdünnt und zu gleichen Teilen in

zwei Küvetten gefüllt. Die eine Küvette wird anschließend mit Nonylhydrochinon zu einer Endkonzentration von  $100\ \mu\text{M}$ , die andere mit gleichem Volumen Meßpuffer versetzt. Das Differenzspektrum dieser beiden Proben wird im Bereich von  $580\ \text{nm}$  bis  $400\ \text{nm}$  aufgenommen und gibt über die vom Redoxzustand abhängige  $\gamma$ -Bande des Cytochrom b bei ca.  $430\ \text{nm}$  Auskunft über den Grad der Reduktion. Mit dem sehr breiten Wellenlängenbereich wird zwar auch die  $\alpha$ -Bande des Cytochrom b bei  $562\ \text{nm}$  erfaßt. Sie ist jedoch bei der hier verwendeten Verdünnung des Komplex III kaum sichtbar. Die niedrigen Konzentrationen werden verwendet, weil zur Untersuchung des Einflusses der Antikörperbindung auf die b-Reduktion sehr kleine Volumina mit sehr hohen Konzentrationen an Immunglobulinen nötig sind. Die Versuchsbedingungen und Puffer entsprechen denen des Aktivitätstests.

### **2.2.3 Reduzierbarkeit des Cytochrom $c_1$ durch Ferrocyclochrom c**

Die Reaktion zwischen Cytochrom  $c_1$  und Ferrocyclochrom c wurde durch Messung des Reduktionsgrades von Ferrocyclochrom c verfolgt. Ferrocyclochrom c, hergestellt nach der Methode von Wharton und Tzagoloff (1967), zeigt bei  $412\ \text{nm}$  ein Absorptionsmaximum, das bei Oxidation des Ferrocyclochromes c zu Ferricytochrom c verschwindet. Ferrocyclochrom c wird in einer Konzentration von  $0.2\ \mu\text{M}$  in der Meßküvette vorgelegt und ein Differenzspektrum gegen eine mit Puffer gefüllte Referenzküvette im Bereich von  $580\ \text{nm}$  bis  $400\ \text{nm}$  aufgenommen. Danach wird zu beiden Küvetten Komplex III zu einer Endkonzentration von ebenfalls  $0.2\ \mu\text{M}$  (äquimolar zu Ferrocyclochrom c) zugegeben. Da Komplex III in beiden Küvetten enthalten ist, hebt sich bei dem nun angefertigten Differenzspektrum eine durch Komplex III verursachte Absorption auf, gemessen wird wieder nur die Absorption des in

der Meßküvette vorgelegten Ferrocytochromes c. Hat in der Meßküvette eine Reaktion zwischen Ferrocytochrom c und dem Komplex III und damit ein Elektronenfluß von Ferrocytochrom c auf Cytochrom c<sub>1</sub> und das Eisenschwefelzentrum des Komplex III stattgefunden, so ist dies an einer Extinktionsabnahme der Bande bei 412 nm zu erkennen.

(Versuchsbedingungen und Puffer wie oben).

Zum Test des Einflusses von Antikörpern werden die funktionellen Tests mit Komplex III durchgeführt, an den bereits Antikörper gebunden haben. Dazu wird die für den jeweiligen Test nötige Menge an Komplex III in 50 µl Inkubationspuffer (= Meßpuffer + 0.05 % Triton X-100) vorgelegt und im Eisbad mit Antikörper für einen Zeitraum von 10 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Antikörperbindung wird unter Berücksichtigung des Volumens der ganze Inkubationsansatz in den Test eingesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Komplex III und seine Untereinheiten

Die zur Immunisierung verwendeten Proteine sind in Abbildung 5 in einer Gelelektrophorese dargestellt und sollen im folgenden Abschnitt kurz charakterisiert werden:

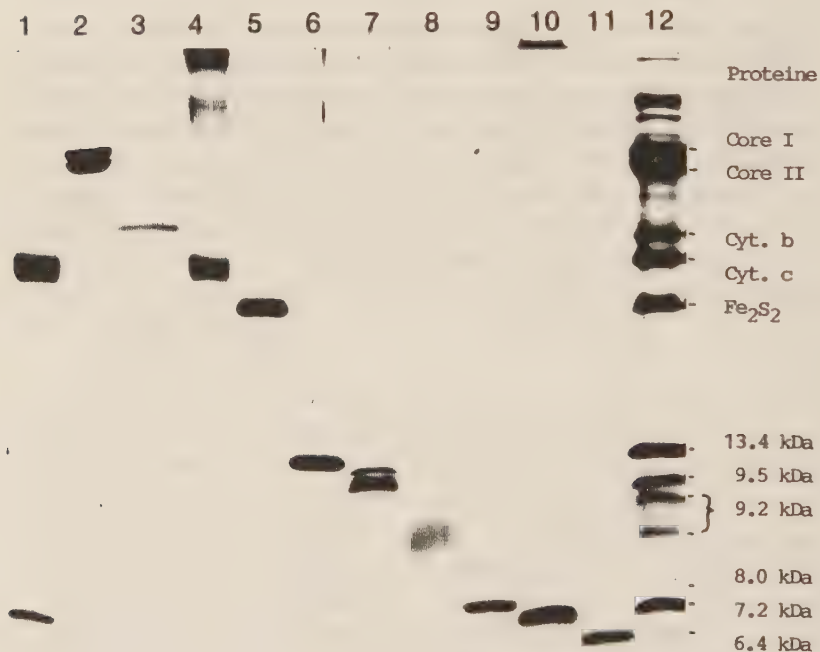


Abbildung 5: SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Komplex III mit dem 9.2 kDa Protein als Doppelbande (Bahn 12), Cytochrom c<sub>1</sub> Subkomplex (Bahn 1) und isolierte Untereinheiten des Komplex III (Bahn 2 bis 11).

**Cytochrom b** (MG = 43.7 kDa), ein Protein mit zwei Hämzentren, erstreckt sich mit 9 Helices quer durch die Membran und weist an beiden Membranoberflächen nur kleine hydrophile Segmente auf (Saraste, 1984; Widger et al., 1984). Auf Grund dieser Anordnung wurde diskutiert, ob Cytochrom b am Transport der Protonen über die Mitochondrienmembran beim Prozeß der Elektronenübertragung beteiligt ist (von Jagow und Engel, 1980; Wikström et al., 1981). Nach Isolierung des Proteins haben beide Hämzentren ihre Reduzierbarkeit durch Ubihydrochinon verloren. Dies könnte durch eine möglicherweise stattgefundenene Denaturierung des Proteins während der Isolierung verursacht sein, könnte aber auch durch fehlende Wechselwirkung mit benachbarten Untereinheiten erklärt werden. Das Protein wurde in löslicher Form zur Immunisierung eingesetzt.

(Hämzentren:  $b_{566}$ , low potential,  $E_m = -30$  mV;  $b_{562}$ , high potential,  $E_m = +90$  mV).

**Cytochrom  $c_1$**  (MG = 27.9 kDa) reagiert mit dem größten Reaktionspartner des  $bc_1$  Komplex, dem Cytochrom c. Das Protein liegt dazu an der Oberfläche der Membran (cytosolische Seite), ist zum größten Teil hydrophil (damit relativ gut zugänglich) und nur mit einem kleinen hydrophoben Anker in der Membran fixiert. Mit einem kovalent gebundenen Hämzentrum ( $E_m = +250$  mV) nimmt es aktiv am Elektronentransport teil. Nach Isolierung liegt dieses Protein unlöslich in Form von großen Aggregaten vor. Die Suspension dieser Aggregate wurde zur Immunisierung verwendet. Cytochrom  $c_1$  könnte auch mit SDS solubilisiert werden, würde damit aber auch weiter denaturiert werden.

Das  **$Fe_2S_2$ -Protein** (MG ca. 25 kDa), nach seinem Entdecker "Rieske"-Eisenschwefelprotein benannt, fungiert ebenfalls als Redoxzentrum ( $E_m = +280$  mV) im Elektronentransport. Es ist dem Cytochrom  $c_1$  sehr eng benachbart und nur locker am Komplex III gebunden. Bereits durch relativ niedrige Detergentskonzentrationen läßt sich das Protein abdissoziieren,

was zu völligem Erliegen der  $bc_1$ -Aktivität führt. Rekonstitutionsversuche mit isoliertem  $Fe_2S_2$ -Protein und Komplex III, von dem das  $Fe_2S_2$  Protein abgespalten worden war, konnten erfolgreich durchgeführt werden. (Engel et al., 1983). Durch die Rekonstitution wurde volle katalytische Aktivität wiedererlangt. Zur Immunisierung wurde das Protein in aggregierter Form eingesetzt.

Das **13.4 kDa Protein**, ein sehr polares Protein, wurde von Yu et al. (1978) als Ubichinon-bindendes Protein beschrieben. Möglicherweise ist es tatsächlich als Strukturkomponente des  $Q_1$ -Zentrums an der Bindung von Ubichinon an der Matrixseite beteiligt (von Jagow et al., 1986). Das Protein durchzieht wahrscheinlich nicht die ganze Mitochondrienmembran, sondern weist lediglich einen hydrophoben Membrananker auf. Für die Immunisierung konnte das Protein erst nach Abtrennen der sehr hohen Detergensüberschüsse verwendet werden.

Das **6.4 kDa Protein**, die kleinste Untereinheit des Komplex III, konnte lange Zeit nur zusammen mit dem Eisenschwefelprotein isoliert werden und ist wie dieses nur sehr locker am Komplex gebunden. Inwieweit es bei Rekonstitutionsversuchen mit dem  $Fe_2S_2$ -Protein eine entscheidende Rolle spielt, ist noch nicht geklärt. Zur Abtrennung des hohen Tritonüberschusses war eine Acetonfällung vor der Immunisierung unumgänglich.

### 3.2 Immunisierung, Produktion von Antikörpern

Zur Produktion von spezifischen Antikörpern wurden je zwei Kaninchen mit Komplex III, Cytochrom b, Cytochrom  $c_1$ ,  $Fe_2S_2$ -Protein, 13.4 kDa und 6.4 kDa Protein immunisiert. Vor der Immunisierung wurde jedem Tier Blut entnommen und ein großer Pool an Kontrollserum gebildet, mit dem die

jeweiligen Referenz- bzw. Nullwerte in den verschiedenen Experimenten ermittelt wurden. Für die Immunisierung der Tiere war es wichtig, daß die zu spritzenden Proteine keine zu hohen Detergenskonzentrationen enthielten, da dies zu starken Reizerscheinungen und Gewebsschädigungen führt. Die Kaninchen wurden folgendermaßen immunisiert:

Für die Erstimmunisierung wurden pro Tier 300 µg Protein in ca. 500 µl mit gleichem Volumen Freundschem Adjuvans Complete emulgiert und am Rücken der Tiere an mehreren Stellen subkutan in Form von kleinen Depots appliziert. Nach 14 und nach 28 Tagen wurde die Impfung mit je 200 µg Protein und Freundschem Adjuvans Incomplete wiederholt. Während Cytochrom c<sub>1</sub>, Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Protein und das 6.4 kDa Protein nur in unlöslicher Form zur Verfügung standen und deshalb nur subkutan verabreicht werden konnten, wurden von den in Lösung vorliegenden Proteinen wie Komplex III, Cytochrom b und 13.4 kDa Protein zusätzlich nach 16 und nach 30 Tagen 200 µg Protein intravenös an der Ohrtrandvene verabreicht.

Die erste Blutentnahme erfolgte 10 Tage nach der letzten Immunisierung, also am 38. bzw. 40. Tag. Sollte mehrmals Blut entnommen werden, so wurde dies unter Einhaltung ausreichender Erholungspausen jeweils 10 Tage nach einer "Auffrischimmunisierung" mit 200 µg Protein, emulgiert in Freundschem Adjuvans Incomplete, durchgeführt. Wie jedoch die Erfahrung zeigte, nimmt mit zunehmender Häufigkeit der Immunisierungen und Blutentnahmen die Höhe der Immunantwort allmählich ab. Deshalb wurden die Tiere nach Erreichen eines entsprechenden Antikörpertiters narkotisiert und nach Eröffnung des Thorax durch Punktion der linken Herzkammer ausgeblutet.

Um eine vollständige Gerinnung zu gewährleisten, wurde das gewonnene Blut über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Eine darauffolgende Zentrifugation des so erhaltenen Serums sollte noch restliche korpuskuläre Bestandteile und Lipide

abtrennen. Die Lagerung der Antiseren erfolgte, um häufiges Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, in 0,5 bzw. 1 ml Portionen bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Abbildung 6: Immunisierungsschema

|                        |                                                                         |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Erstimmunisierung      | 300 $\mu\text{g}$ Protein mit Freundschem Adjuvans Complete subkutan.   |
| 14. Tag                | 200 $\mu\text{g}$ Protein mit Freundschem Adjuvans Incomplete subkutan. |
| 16. Tag                | 200 $\mu\text{g}$ Protein intravenös.<br>(nur bei löslichen Proteinen)  |
| 28. Tag                | 200 $\mu\text{g}$ Protein mit Freundschem Adjuvans Incomplete subkutan. |
| 30. Tag                | 200 $\mu\text{g}$ Protein intravenös.<br>(nur bei löslichen Proteinen)  |
| 10 Tage später         | Blutentnahme                                                            |
| Auffrischimmunisierung | 200 $\mu\text{g}$ Protein mit Freundschem Adjuvans Incomplete subkutan. |
| 10 Tage später         | Blutentnahme                                                            |

.

## Tabelle 5: Immunisierungstabelle

| Tier Nr.      | immunisiert mit Protein                 |
|---------------|-----------------------------------------|
| Nr. 1 und 2   | Komplex III                             |
| Nr. 3 und 4   | 13.4 kDa Protein                        |
| Nr. 5 und 6   | Cytochrom b                             |
| Nr. 7 und 8   | 6.4 kDa Protein                         |
| Nr. 9 und 10  | Cytochrom c <sub>1</sub>                |
| Nr. 11 und 12 | Fe <sub>2</sub> S <sub>2</sub> -Protein |

### 3.3 Reinigung von Immunglobulinen

Um unerwünschte Nebeneffekte von Serumbestandteilen ausschließen zu können, sollten die in Kaninchen induzierten Antikörper aus dem Serum isoliert werden. Dazu bot sich zunächst eine Affinitätschromatographie an, bei der das Antigen an ein Säulenmaterial gekoppelt, die Antikörper bei Durchlauf der Antiseren gebunden und nach einem Waschvorgang eluiert wurden. Dahingehende Versuche mit Antiserum gegen Komplex III scheiterten jedoch, da es sich bei dem Komplex III um einen aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzten Enzymkomplex handelt. Es ist zwar möglich, das Protein an ein Säulenmaterial (z.B. Hydroxyapatit) zu binden, doch erwies sich der Komplex III in seiner isolierten Form als zu labil und es zeigte sich, daß beim Versuch der Ablösung der Antikörper auch Untereinheiten wie z.B. das Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Protein, das sehr schwach am Komplex III gebunden ist, mit von der Säule eluiert wurden. Um diesem Problem aus dem Weg zu gehen, müsste man jede einzelne Untereinheit des Komplex III an das Säulenmaterial binden und auf diese Weise die Antikörper für jede einzelne Untereinheit getrennt isolieren. Diese Methode hätte den Vorteil, daß alle Antikörper, völlig

unabhängig davon, welcher Klasse von Immunglobulinen diese angehören, isoliert wurden.

Da es sich jedoch bei den durch Immunisierung induzierten Antikörpern zu 90 % um Immunglobuline der Klasse G handelt und die oben beschriebene Isolierungsmethode sehr material- und zeitaufwendig ist, erschien die sehr einfache Affinitätschromatographie mit Protein A als ausreichend. Dazu wurde eine bereits fertig gekoppelte Protein A-Säule (5 ml) der Firma Biorad verwendet. Alle Arbeitsgänge wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

2 ml Serum wurden aufgetaut und nochmals zentrifugiert (100 000 g, 30 Min.). Nach Verdünnung mit 2 ml PBS-Puffer wurde das Serum auf die mit PBS-Puffer pH 7,2 äquilibrierte Protein A-Säule aufgetragen. Der Durchlauf der Säule wurde mit einem UV-Schreiber bei 280 nm verfolgt. Nach Bindung der IgG wurden die restlichen Serumbestandteile durch Spülen mit 4- bis 5-fachem Säulenvolumen PBS-Puffer abgetrennt. Die Elution der so gereinigten IgG erfolgte mit 0,1 M Citratpuffer, pH 2,8. Die pH-Neutralisation wurde mit 1 M  $K_3PO_4$  durchgeführt. Abschließend wurde auf das Serumausgangsvolumen druckfiltriert und eine Proteinbestimmung nach Helenius und Simons (1972) durchgeführt. Die Immunglobuline wurden nach Portionierung bei -20°C gelagert.

PBS-Puffer:      150 mM NaCl  
                  1 mM  $KH_2PO_4$   
                  8 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$   
                  2 mM KCl

pH 7.2

Citratpuffer:    38.3 Vol% 0.1 M Natriumcitrat  
                  61.7 Vol% 0.1 N Salzsäure

ergibt pH 2.8

### 3.4 Charakterisierung der IgG

Bei den mit der Protein A - Säule isolierten Antikörpern handelt es sich um Immunglobuline der Klasse G (IgG). Sie besitzen ein Molekulargewicht von 150 000 Da und bestehen aus zwei leichten (25 000 Da) und zwei schweren Ketten (50 000 Da). Diese Ketten sind durch mehrere Disulfidbrücken untereinander verbunden und bilden ein Molekül mit der Form eines "Y" (siehe Abbildung 7).

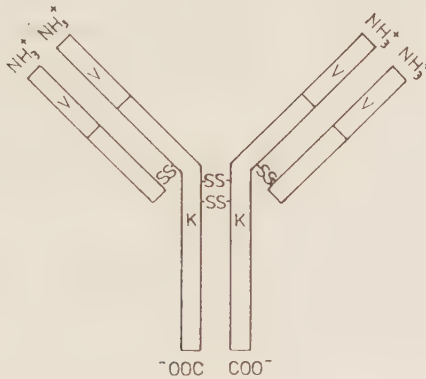


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur von Immunglobulinen der Klasse G

Während der untere Teil der IgG - Moleküle relativ konstant ist, sind die in Abbildung 7 mit V gekennzeichneten Domänen bezüglich der Aminosäuresequenz und Struktur sehr variabel. Sie stellen die Antikörperbindungsstellen dar und sind verantwortlich für die hohe Spezifität der Immunglobu-

line gegenüber den verschiedenen antigenen Determinanten.

Um die Homogenität der präparierten IgG zu überprüfen, wurden diese auf einer Gelsäule, Sephacryl S 200 (100 ml), chromatographiert. Als Referenzsubstanz wurde käufliches  $\gamma$ -Globulin von Rind (Firma Biorad) mit den präparierten IgG bezüglich seines Laufverhaltens korreliert. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 8 dargestellt. Wie deutlich zu erkennen ist, zeigt  $\gamma$ -Globulin zwei nebeneinanderliegende Maxima: Durchlaufvolumen a, den größeren Globulinen entsprechend, und Durchlaufvolumen b, stellvertretend für Immunglobuline der Klasse G. Der Lauf mit den selbst präparierten IgG weist ebenfalls bei Durchlaufvolumen b ein sehr einheitliches Maximum auf, was eine Homogenität dieser IgG beweist.

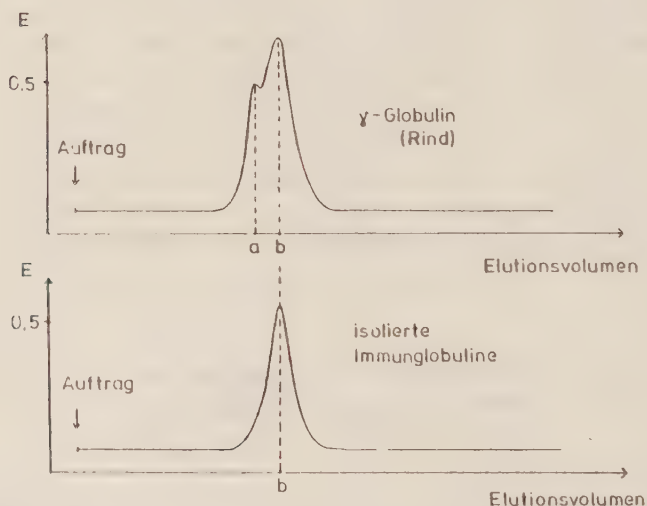


Abbildung 8: Elutionsprofil der Säulenchromatographie (Sephacryl S 200); Vergleich der präparierten IgG mit  $\gamma$ -Globulin (Rind).

### 3.5 Immunoblotting

Um die Spezifität der erhaltenen Antikörper zu überprüfen, galt es, deren Bindung an die eingesetzten Antigene nachzuweisen. Zu diesem Zweck kann ein Doppeldiffusionstest im Agarosegel nach der Methode von Ouchterlony durchgeführt werden, der von Sidhu und Beattie (1982) auch schon für Proteine des Komplex III als Antigene beschrieben wurde. Dabei soll die spezifische Ag-Ak Bindung durch Auftreten einer scharfen Präzipitationslinie bewiesen werden. Da aber als Antigen hauptsächlich wasserunlösliche Membranproteine eingesetzt wurden, ist dieser Test hier nicht ganz eindeutig. Präzipitationslinien könnten auch allein durch unspezifische Aggregation der schlecht wasserlöslichen Proteine mit sich selbst oder mit anderen Proteinen zustandekommen. Das Ergebnis könnte dadurch verfälscht werden. Einen sehr sicheren Nachweis auch für Membranproteine liefert dagegen die erstmals bei Towbin (1979) beschriebene Methode des Immunoblottings. Das Antigen wird dazu auf dem Trägermaterial Nitrozellulose fixiert und die Antikörperbindung nach Inkubation des Trägermaterials mit den Antisera nachgewiesen.

#### 3.5.1 Elektrophoretischer Transfer:

Nach Auftrennung mit Hilfe der beschriebenen SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden die 11 Untereinheiten des Komplex III aus dem noch nicht gefärbten Gel in einem elektrischen Feld auf Nitrozellulosepapier transferiert und dort gebunden. Dazu wurde in Anlehnung an die Arbeit von Manabe (1984) eine Transferkammer mit einigen Abänderungen angefertigt (siehe Abbildung 9).

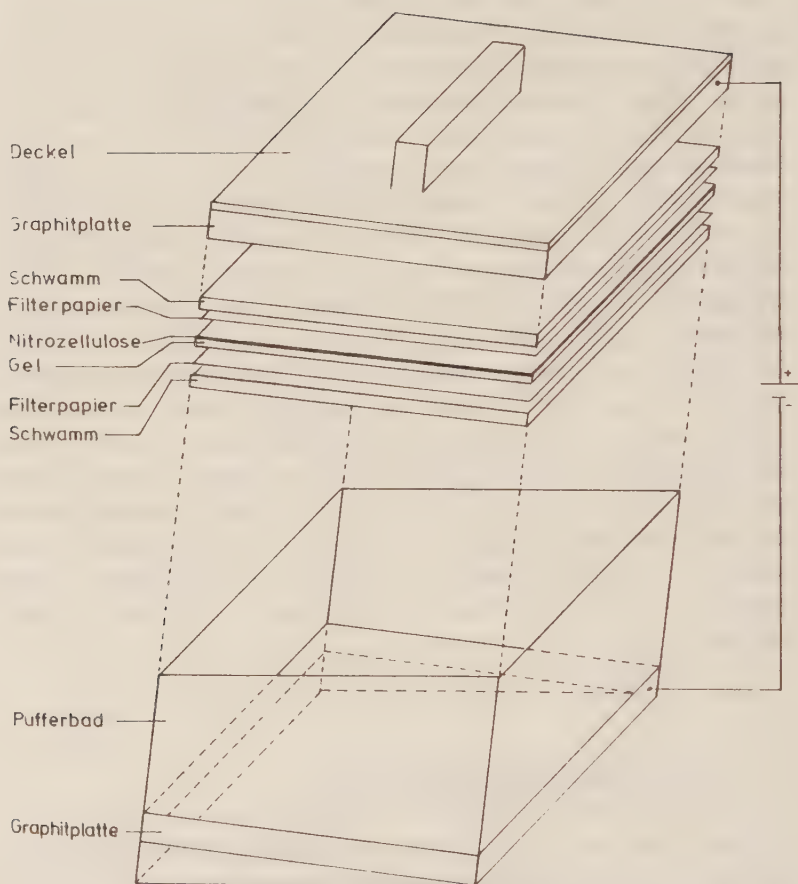


Abbildung 9: Selbst angefertigte Transferkammer; als Grundlage dazu diente die Arbeit von Manabe (1984).

Die aus PVC hergestellte Kammer besteht aus einem schräg stehenden Pufferbad, was das Entweichen von beim Transfer entstehenden Blasen ermöglichen soll. Am Boden der Kammer ist als Kathode eine Graphitplatte (15 x 15 x 1 cm) festgeklebt. Als Anode dient eine zweite Graphitplatte, die an einem beweglichen Deckel befestigt ist, der sich in die Kammer einführen und der Kathode je nach Dicke des dazwischenliegenden Gels beliebig weit nähern läßt. Für den Transfer wird die Kammer mit ca. 500 ml Transferpuffer (0,25 M Tris, 0,19 M Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) gefüllt. Ein auf Gelgröße zugeschnittenes Blatt Nitrozellulose (0.45  $\mu$ m Porengröße) wird angefeuchtet und auf das Gel gelegt. Das Gel sollte direkt nach Beendigung der SDS Gelelektrophorese verwendet werden, um eine Diffusion der Proteinbanden im Gel infolge längerer Lagerung zu vermeiden. Zur Absicherung einer zuverlässigen Zuordnung nach dem Transfer wird das Nitrozelluloseblatt durch entsprechende Einschnitte in Höhe der Auftragungsstellen der Proben markiert. Vor dem Einlegen in die Transferkammer wird zur Erzielung einer guten Leitfähigkeit auf beiden Seiten je ein Blatt Filterpapier und ein feuchtes Schwammtuch aufgelegt.

Bei all diesen Arbeitsgängen ist darauf zu achten, daß zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen eingeschlossen werden, da dies die Homogenität des elektrischen Feldes und damit den Transfer der Proteine stören würde. Das entstandene "Sandwich" ist nun so in die Kammer einzubringen, daß das Nitrozellulosepapier nach oben, also zur Anode hin, zu liegen kommt. Der Deckel der Kammer wird in das Pufferbad abgesenkt und nach kurzem Andrücken mit einem Auflagegewicht beschwert. Der Transfer kann nun durch Anlegen der entsprechenden Spannung durchgeführt werden.

## **Transferbedingungen**

Der Elektrottransfer von Proteinen aus Gelen auf Nitrozellulose besteht im wesentlichen aus zwei Vorgängen (Gershoni und Palade, 1984):

### **1. Elution der Proteine aus dem Gel**

Die Proteine wandern entsprechend den Bedingungen der SDS Gelelektrophorese bei einem pH des Transferpuffers von 8.3 zur Anode. Wichtige Parameter neben dem pH-Wert sind die Porengröße des Gels sowie die angelegte Spannung. Das im Puffer enthaltene Methanol soll eine Quellung des Gels verhindern, fixiert jedoch auch die Proteine im Gel und erschwert damit die Elution.

### **2. Adsorption der Proteine an die Nitrozellulose**

Die Nitrozellulosemembran wirkt bei einer Porengröße von  $0.45\ \mu\text{m}$  weniger in Form eines Oberflächenfilters (vergleichbar einem Sieb), sondern eher als "Tiefenfilter". Die einzelnen Proteinuntereinheiten des Komplex III (Durchmesser Gesamtkomplex ca. 20 nm) könnten rein von der Größe her das Nitrozellulosepapier zwar passieren, auf ihrem Weg durch die Membran findet jedoch auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen eine Bindung bzw. Immobilisierung der Proteine statt. Neben der Bindung wird gleichzeitig eine Renaturierung der durch SDS aufgefalteten Proteine diskutiert. SDS muß dazu abdissoziieren. Damit wären die Proteine in nativer Form an Nitrozellulose fixiert und für spätere Versuche mit spezifisch bindenden Immunglobulinen (Größe der IgG ca.  $15 \times 9 \times 5\ \text{nm}$ ) frei zugänglich.

Voraussetzung für einen erfolgreichen Immunoblot war es, möglichst alle 11 verschiedenen Proteinuntereinheiten des Komplex III in nachweisbarer Menge auf Nitrozellulose zu transferieren, was sich auf Grund ihrer sehr unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich Größe, Polarität, Löslichkeit, Färbeverhalten, Bindungseigenschaften etc. als nicht ganz einfach erwies. Quantitative Aspekte spielten nur eine

untergeordnete Rolle. Das verwendete Gelelektrophoresesystem ist mit 16 % Polyacrylamid relativ engmaschig. Eine niedrigere Polyacrylamidkonzentration würde zwar den Transfer erleichtern, ist jedoch zur eindeutigen Auftrennung aller Untereinheiten nicht geeignet. Bereits im Gel (15 x 15 x 0,15 cm) lassen sich nach Färbung mit Coomassie einige Banden nur schwach und zum Teil verwischt erkennen (vergleiche Abbildung 5). Bei einem maximalen Auftrag von 50 µg Protein pro Bahn sind die beiden Core Proteine intensiv gefärbt und unzureichend voneinander getrennt. Die Bande des Cytochrom b ist nach der Anfärbung relativ schwach sichtbar und nach oben hin verwischt. Cytochrom c<sub>1</sub>, das Eisenschwefelprotein und das 7.2 kDa Protein stellen scharf getrennte Banden dar, die sich gut anfärben lassen. Das 9.2 kDa Protein liefert auf Grund von unvollständig gespaltenen intramolekularen Disulfidbrücken eine Doppelbande (Schägger, unveröffentlicht). Die Proteine 9.5 kDa, 8.0 kDa und 6.2 kDa werden mit Coomassie relativ schlecht angefärbt. Vor allem im oberen Bereich des Gels sind Abbauprodukte oder Verunreinigungen zu beobachten. Eine Färbung des Gels nach durchgeführtem Transfer zur Identifizierung der Banden war wenig hilfreich, da nur noch größere Proteine nachweisbar waren, die kleineren Untereinheiten aber fast völlig eluiert und dazu die Gelgröße durch den Färbevorgang nicht unerheblich verändert war.

Die Effektivität des Transfers wurde an einem kleinen Streifen der mit Protein beladenen Nitrozellulose überprüft. Während die Coomassie Blaufärbung unbrauchbar war, erwies sich die Färbemethode mit kolloidalem Silber (M. Moeremans, 1985) als empfindliche Proteinnachweismethode. Dabei empfiehlt sich, die bei dieser Färbemethode verwendete Tween-20 Konzentration von 0.3 % auf 0.05 % zu reduzieren. Der Transfer von dünneren Gelen (14 x 14 x 0.075 cm) erwies sich günstiger als der von Gelen mit der früher verwendeten Dicke von 1.5 mm, da durch die Reduzierung der Schichtdicke

eine stärkere Fokussierung der Banden erzielt werden konnte.

Zu Beginn des Transfers findet auf Grund der relativ niedrigen Ionenstärke des Transferpuffers eine Quellung des Gels statt, was zur Verwischung der Banden auf dem Nitrozellulosepapier führt. Eine höhere Methanolkonzentration im Puffer könnte dem zwar entgegenwirken, würde aber die Proteine zu stark im Gel fixieren. Eine Inkubation des Gels im Transferpuffer für längere Zeit wurde ebenfalls vermieden mit der Überlegung, daß dadurch ein Auseinanderdiffundieren der Banden gegeben sein könnte. Um dem Problem der Quellung trotzdem aus dem Weg zu gehen, wurde der Transfer in zwei zeitliche Phasen unterteilt. Zuerst erfolgte ein Transfer für 5 Minuten bei 200 mA. Während dieser Zeit soll hauptsächlich ein Wassereinstrom und damit die Quellung des Gels stattfinden, die Proteine wegen ihrer Größe und ihrer damit geringeren Wanderungsgeschwindigkeit nur wenig eluiert werden. Auf der dabei eingelegte Nitrozellulose lassen sich jedoch schon nach so kurzer Zeit mehrere schwache Proteinbanden, wie z.B. die beiden Core Proteine, das Cytochrom  $c_1$ , das  $Fe_2S_2$ -Protein, die Proteine 13.4 kDa, 9.6 kDa, 8.0 kDa und 7.2 kDa mit der Silberproteinfärbung nachweisen (siehe Abbildung 10, rechter Nitrozellulosestreifen).

Um in einer zweiten Phase alle Proteinbanden zu transferieren, wurde unter Verwendung einer neuen Nitrozellulosemembran mit dem nun gequollenen Gel ein Transfer von mindestens 2 Stunden bei konstant 200 mA durchgeführt. Der Proteinverlust, der mit dem ersten Transfer von 5 Minuten Dauer bewirkt wurde, erwies sich als unbedeutend, die Methode später sogar als sehr nützlich, da mit diesem anfänglichen Transfer auch ein Nitrozelluloseblatt zu Verfügung stand, auf dem nur wenig Protein gebunden war. Die Nitrozellulose mit der Transferzeit von 2 Stunden ist ebenfalls in Abbildung 10 dargestellt (Silberproteinfärbung, linker Streifen).

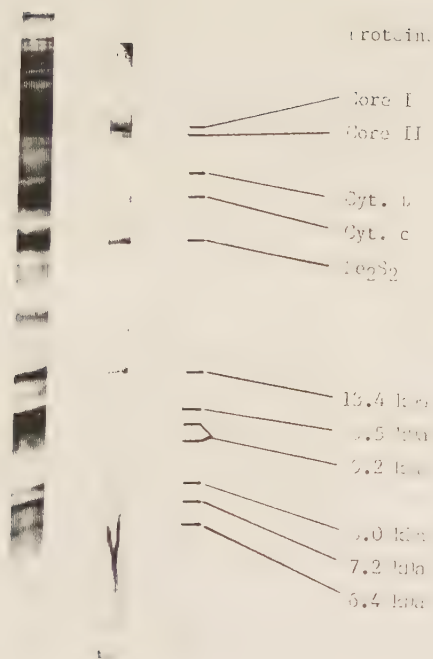


Abbildung 10: Silberproteinfärbung an Nitrozellulosestreifen nach erfolgtem Transfer; Transferzeit linker Streifen 2 Stunden, rechter Streifen 5 Minuten.

Zu erkennen sind jetzt als intensiv gefärbte Banden Core Protein I und II, Cytochrom  $c_1$ , das  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ -Protein, sowie das 13.4 kDa und 9.5 kDa Protein. Die Bande des Cytochrom b ist kaum zu erkennen und nach oben hin verwischt, die kleineren Proteine zwar schwächer gefärbt aber doch gut abgegrenzt. Von dem 9.2 kDa Protein, das sich in dem verwendeten 16 %

Polyacrylamidgel als Doppelbande darstellt, ist nur die obere Bande zu erkennen, die untere Bande ist unklar. Dies dürfte weniger durch schlechte Anfärbbarkeit als vielmehr durch unzureichende Bindung an die Nitrozellulose zu erklären sein, wenn man bedenkt, daß das 9.2 kDa Protein mit 8 Glutaminsäureresten sehr sauer ist und deswegen bei einem pH von 8.3 nur sehr schlecht über hydrophobe Wechselwirkungen an Nitrozellulose binden kann. Auch die sehr wasserlöslichen Proteine 13.4 kDa und 8.0 kDa sind relativ schwach gebunden, da sie bereits durch eine Tween-20 Konzentration von 0.3 % abgelöst werden konnten.

### 3.5.2 Inkubation des Trägermaterials mit Antiseren

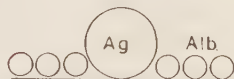
Nach dem Transfer der Proteine wird die Nitrozellulose entsprechend den Bahnen des Polyacrylamidgels in Streifen geschnitten. Dazu bedient man sich der vorher angebrachten Markierungen (siehe Seite 33) und orientiert sich gleichzeitig an der bereits schwach sichtbaren, leicht gelblichen Bande der Cytochrom  $c_1$ -Untereinheit. Ein Streifen wird als Kontrollstreifen mit kolloidalem Silber nach der Methode von M. Moeremans et al. angefärbt, die restlichen Streifen werden mit den verschiedenen Antiseren inkubiert. Durch eine zu diesem Zweck angefertigte Inkubationskammer mit mehreren voneinander getrennten Fächern (14 x 1 x 3 cm) konnten die aufwendigen Spül- und Waschvorgänge erheblich vereinfacht und die nötigen Inkubationsvolumina verringert werden. Pro Nitrozellulosestreifen waren 2 ml Inkubationslösung ausreichend. Die mit doppeltem Volumen eingesetzten Spüllösungen konnten schnell pipettiert und nach ausreichender Spüldauer mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden, ohne dabei die Nitrouellulosestreifen zu berühren.

Alle Arbeitsgänge wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Während der Inkubationszeiten stand die Inkubationskammer

auf einer Wippe, was ein ständiges leichtes Schwenken der Nitrozellulosestreifen in den jeweiligen Lösungen gewährleistete. Detergenezusätze in Spüllösungen verringerten die Empfindlichkeit des Tests erheblich, einige Immunkomplexe wurden dadurch verhindert beziehungsweise abgelöst. Der Versuchsablauf ist im folgenden dargestellt:

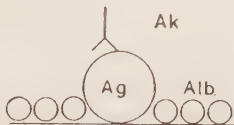
|             |             |        |
|-------------|-------------|--------|
| TBS-Puffer: | 20 mM Tris  |        |
|             | 500 mM NaCl | pH 7.2 |

**Blocken (1 Std):** Die Streifen werden in TBS-Puffer mit 3 % Rinderserumalbumin geschwenkt. Dadurch werden die noch freien Proteinbindungsstellen des Nitrozellulosestreifens mit Albumin abgesättigt und die unspezifische Adsorption von Proteinen der Antiseren an die Nitrozellulose verhindert.



**Spülen (2 x 5 Min)** mit TBS-Puffer; alles nicht gebundene Protein wird weggespült.

**Inkubieren mit Antiseren (1.5 Std):** Die verschiedenen Antiseren werden mit TBS-Puffer 1:50 verdünnt, Endvolumen 2 ml. Die in den Seren enthaltenen Antikörper können damit ihre korrespondierenden Antigene, d.h. die auf der Nitrozellulose fixierten Proteinbanden (Untereinheiten des Komplex III) erkennen und spezifisch an diese binden.

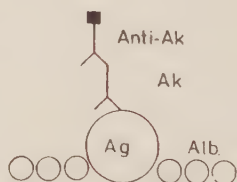
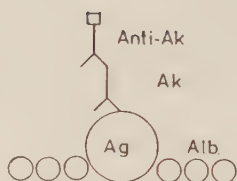


**Spülen (4 x 5 Min)** mit TBS-Puffer. Alle anderen nicht spezifisch gebundenen Antikörper werden dadurch entfernt.

**Inkubieren mit Anti-Antikörper (2 Std):** Mit Peroxidase markierte, gegen Immunglobuline von Kaninchen gerichtete Anti-IgG-Antikörper aus Ziege (Firma Miles) werden in TBS-Puffer 1:2000 verdünnt und mit 10 % fötalem Kälberserum versetzt. Dieser Indikatorantikörper bindet an die spezifisch gebundenen Antikörper.

**Spülen (4 x 5 Min)** mit TBS-Puffer, der Überschuß an Anti-Antikörper wird dadurch entfernt.

**Färben (Shawver et al., 1984):** Die Proteinbanden, an die spezifische Antikörper gebunden haben, können nun angefärbt werden, da die Anti-Antikörper Peroxidase kovalent gebunden haben. Dazu werden 60 mg 4-Chloro-1-naphthol in 20 ml eiskaltem Methanol gelöst und mit 100 ml TBS-Puffer (4°C) und 60 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) vermischt. Die Färbung wird nach Eintauchen der Nitrozellulosestreifen in diese Lösung schnell sichtbar und kann durch Waschen der Streifen mit kaltem Wasser gestoppt werden.



Bei allen Farbreaktionen, die von Peroxidase katalysiert werden, sollten Zusätze oder Verunreinigungen mit Natriumazid vermieden werden, da dadurch die Aktivität des Enzyms beeinträchtigt und die Farbreaktion entsprechend vermindert wird (P. Tijssen, 1985).

### 3.6 Spezifität der Antiseren im Immunoblotting

Um die Problematik des Immunoblottings etwas zu verdeutlichen, wurde dieser sowohl mit der sehr kurzen Transferzeit von 5 Minuten (Immunoblot B), als auch mit der langen Transferzeit von 2 Stunden (Immunoblot A) durchgeführt. In Abbildung 11 ist zunächst der Immunoblot A der verschiedenen Antiseren dargestellt. Zur Identifizierung der Banden wurde die Silberproteinfärbung S herangezogen.

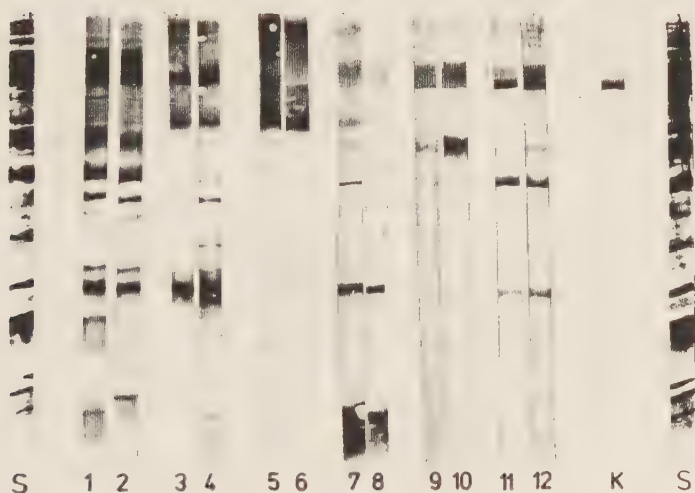


Abbildung 11: Immunoblot A mit einer Transferzeit von 2 Stunden; Erläuterungen siehe Text.

**Antiserum Nr. 1 und 2** (Anti-Komplex III) zeigen eine Immunreaktion mit fast allen Proteinuntereinheiten des Komplex III: Core Protein I und II, Cytochrom b, Cytochrom  $c_1$ ,  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ -Protein, 13.4 kDa und 7.2 kDa Protein. Eine Reaktion mit dem 9.5 kDa und 6.4 kDa Protein zeigt nur Serum Nr. 1.

Sowohl bei Antiserum Nr. 1 als auch bei Antiserum Nr. 2 ist so gut wie keine Reaktion mit dem 8.0 kDa und dem 9.2 kDa Protein zu beobachten. Weitere nicht zu Komplex III gehörende Banden sind sichtbar im oberen Bereich und zwischen dem  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ - und 13.4 kDa Protein. Antiserum **Nr. 3 und 4** wurden durch Immunisierung mit dem 13.4 kDa Protein gewonnen und zeigen eine sehr deutliche Immunreaktion mit diesem Protein. Daneben scheint auch eine Antikörperbindung vor allem an die Core Proteine und an Cytochrom b stattgefunden zu haben. Die Antiseren **Nr. 5 und 6** enthalten die mit Cytochrom b induzierten Antikörper. Anscheinend haben viele Immunglobuline nicht nur an das Cytochrom b, sondern auch an andere Proteine oberhalb dieser Bande gebunden. Die Anti-6.4 kDa-Seren **Nr. 7 und 8** zeigen neben der Immunreaktion mit der entsprechenden Proteinuntereinheit vor allem eine Reaktion mit dem 13.4 kDa Protein. Während Antiserum **Nr. 9** fast keine Reaktion mit dem als Antigen eingesetzten Cytochrom  $c_1$  zeigt, ist bei Serum **Nr. 10** eine stärkere Antikörperbindung zu beobachten. Die Antiseren **Nr. 11 und 12** sind gegen das Eisenschwefelprotein gerichtet, reagieren aber scheinbar auch mit dem 13.4 kDa Protein, dem Cytochrom  $c_1$  und den Core Proteinen. Etwas überraschend das **Kontrollserum K**, das (vor der Immunisierung entnommen) scheinbar Antikörper gegen beide Core Proteine enthält.

Führt man den Immunoblot mit nur kurzer Transferzeit durch (Immunoblot B), so läßt sich ein etwas anderes Ergebnis feststellen (Abbildung 12):

Serum **Nr. 1 und 2** (Anti-Komplex III) zeigen die Banden Core Protein I und II, Cytochrom b, Cytochrom  $c_1$ , Eisenschwefelprotein und 13.4 kDa Protein. Serum **Nr. 3 und 4** (Anti-13.4 kDa Protein) reagieren mit dem 13.4 kDa Protein, den beiden Core Proteinen und Cytochrom b. Die Seren **Nr. 5 und 6** (Anti-Cytochrom b) weisen eine Antikörperbindung nur an das Cytochrom b auf, die nach oben hin verwischte Bande

dieses Proteins ist im Immunoblot deutlicher ausgeprägt als im Gel. Für die Seren **Nr. 7 und 8** (Anti-6.4 kDa Protein) ist eine Immunreaktion mit dem 6.4 kDa Protein sichtbar, obwohl mit der Silberproteinfärbung nach dem Transfer (5 Minuten) die entsprechende Antigenbande auf der Nitrozellulose nicht nachweisbar war. Serum **Nr. 9** (Anti-Cytochrom  $c_1$ ) zeigt kaum eine Reaktion, Serum **Nr. 10** (Anti-Cytochrom  $c_1$ ) eine deutliche Antikörperbindung an Cytochrom  $c_1$ . Serum **Nr. 11 und 12** (Anti- $\text{Fe}_2\text{S}_2$ -Protein) reagieren mit ihrem entsprechenden Antigen, dem Eisenschwefelprotein. Eine spezifische Reaktion dieser beiden Seren sowie der Antiseren Nr. 7 und 8 mit dem 13.4 kDa Protein kann nicht ausgeschlossen werden. Das **Kontrollserum K** erkennt spezifisch keines der Antigene.

Zur Erklärung der unterschiedlichen Versuchsergebnisse wird auf die Diskussion verwiesen.

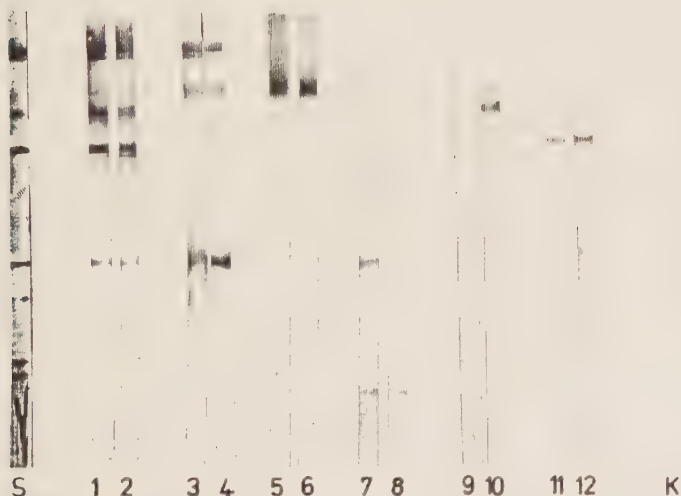


Abbildung 12: Immunoblot B mit kurzer Transferzeit (2 Minuten); Erläuterungen siehe Text.

### 3.7 Bestimmung der Titer der Antiseren im ELISA

Die Bestimmung der Titer der Antiseren mit Hilfe des ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) entspricht im Prinzip der Methode des Immunoblottings, ermöglicht jedoch eine quantitative Aussage. Wurde im Immunoblotting gezeigt, mit welchen Untereinheiten des Komplex III die verschiedenen Antiseren reagieren, so kann hier der Titer der Antiseren bestimmt werden. Darunter versteht man die größtmögliche Verdünnung der Antiseren, bei der gerade noch eine Immunreaktion mit dem vorgelegten Komplex III als Antigen nachweisbar ist.

Es wurden flexible Mikrotiterplatten der Firma Dynatech verwendet, die sich während aller Arbeitsgänge auf einem Aluminiumblock im Eisbad befanden. Alle Lösungen, die in die Platten pipettiert werden sollten, wurden vorher auf eine Temperatur von 4°C gebracht. Der Test wurde nach der indirekten Methode (Voller et al., 1976) durchgeführt. Das Antigen sollte dabei nicht wie im Immunoblotting an Nitrozellulose, sondern an die Oberfläche der Mikrotiterplatten gebunden werden. Um diese Bindung, die auf Wechselwirkungen zwischen Plattenkunststoff und Protein beruht, zu gewährleisten, muß das Antigen einerseits in löslicher Form vorliegen (bei Membranproteinen wie Komplex III nur mit Detergentien zu erreichen), andererseits muß die Detergentskonzentration so gering wie möglich sein, da eine hohe Konzentration die Bindung des Proteins an den Plattenkunststoff beeinträchtigt (Suissa et al., 1983). Bei der Adsorption des Antigens ist außerdem noch zu beachten, daß die Bindungseigenschaften der Mikrotiterplatten je nach Charge verschieden sein können (Kricka et al., 1980), weswegen alle Tests mit Platten der gleichen Charge durchgeführt werden sollten. Bei der Durchführung des Tests wurde wie beim Immunoblotting jeglicher Detergentszusatz zu Spüllösungen vermieden.

TBS-Puffer:            20 mM Tris  
                             500 mM NaCl                                pH 7.2

Citratpuffer 0.1 M:

|         |                     |
|---------|---------------------|
| 41 Vol% | 0.1 M Citronensäure |
| 59 Vol% | 0.1 M Natriumcitrat |

ergibt pH 5

Isolierter Komplex III, der bei der beschriebenen Präparationsmethode nach Versetzen mit Glycerin ungefähr 0,03 % TX-100 enthält, wird mit 200 mM NaCl, 20 mM MOPS zu einer optimalen Proteinkonzentration von 0,05 mg/ml verdünnt. Von dieser Verdünnung, bei der die Detergenskonzentration den Komplex III gerade noch in Lösung hält, werden auf die Platte pro Vertiefung 100 µl (das entspricht 5 µg Protein) pipettiert und 3 Std im Eisbad inkubiert. Dabei dürften, wie Cantarero et al. (1980) für ein großes Spektrum von Antigenen berichteten, ungefähr 10-20 % der vorgelegten Proteinmenge an die Mikrotiterplatten binden.

Nach erfolgter **Antigenadsorption** wird das überschüssige, nicht gebundene Protein durch einen zweimaligen **Waschvorgang** mit TBS-Puffer gewegewaschen. Zu diesem Zweck werden die Mikrotiterplatten nach Umdrehen und Ausklopfen in Waschpuffer getaucht und nach Auffüllen der Plattenvertiefungen wieder gewendet und entleert.

Anschließend werden die noch freien Proteinbindungsstellen in den Plattenvertiefungen entsprechend dem **Blockvorgang** beim Immunoblotting mit Albumin abgesättigt, d.h. die Mikrotiterplatten werden für 1,5 Std mit 100 µl/Vertiefung mit TBS-Puffer und 3 % Albumin inkubiert.

Nach zweimaligem **Waschen** werden die zu testenden Antiseren in der gewünschten Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$ , Verdünnung mit TBS-Puffer) auf die Platten aufgetragen (100  $\mu$ l/Vertiefung) und damit die Bindung spezifischer **Antikörper** an das Antigen ermöglicht. Von jeder Verdünnungsreihe wird eine Doppelwertbestimmung durchgeführt. Um

später die Auswertung der einzelnen Platten miteinander vergleichen und eventuell auftretende geringfügige Abweichungen in den Versuchsbedingungen mitteln zu können, werden auf jeder Platte neben zwei Verdünnungsreihen mit Kontrollserum zwei Werte mit einer konstanten Referenzverdünnung mitgeführt. Diese Referenzverdünnung wurde aus Antiserum gegen Gesamtkomplex einer Blutentnahme einmalig in größerer Menge in einer 1:100 Verdünnung hergestellt und portionsweise eingefroren.

Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wird nicht gebundenes Protein durch fünf **Waschvorgänge** mit TBS-Puffer entfernt.

Spezifisch gebundene Antikörper werden wie beim Immunoblotting mit einem **Anti-Antikörper** nachgewiesen: Inkubation für 1,5 Std mit 100 µl/Vertiefung Anti-Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung mit 10 % fötalem Kälberserum. Der überschüssige Anti-Antikörper wird durch weitere fünf **Waschvorgänge** beseitigt. Die abschließende Redoxfarbreaktion wird durch Zugabe von Substrat gestartet (2 mg/ml o-Phenylen-diamin + 2 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% in 0.1 M Citratpuffer, pH 5, 120 µl/Vertiefung). Die **Farbreaktion** wird mit 50 µl Schwefelsäure 0.5 N gestoppt, sobald die Extinktion der Referenzwerte einen vorgegebenen Wert von 1.2 erreicht hat. Die Messung der Platte wird in einem ELISA-Photometer bei 492 nm durchgeführt. Im Falle einer Abweichung der mitgeführten Referenzwerte von 1.2 werden alle Extinktionswerte der jeweiligen Mikrotiterplatte um einen entsprechenden Faktor korrigiert.

Nach Auftragung der korrigierten Extinktionswerte gegen die eingesetzten Verdünnungsreihen wurden die Titer definiert als die letzten Verdünnungen, die eine Extinktion größer als die höchsten Extinktionswerte des Kontrollserums lieferten (siehe Abbildung 13).

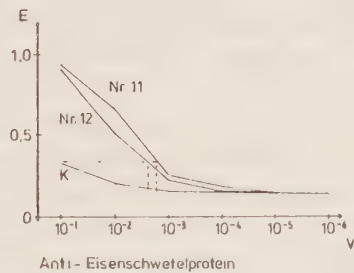
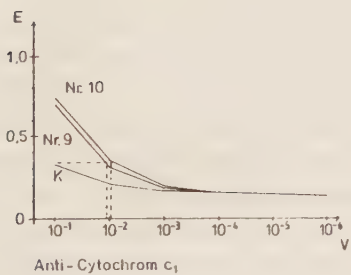
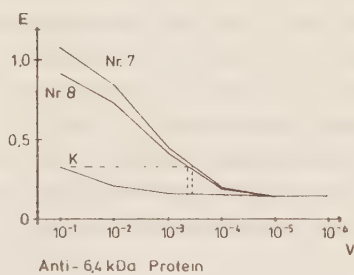
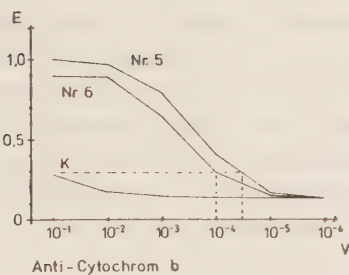
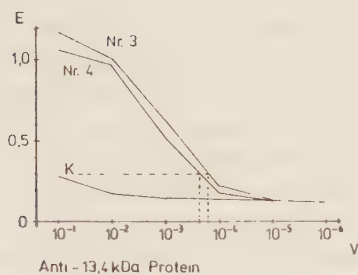
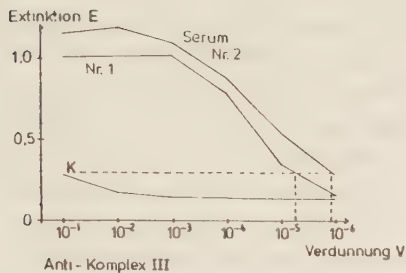


Abbildung 13: Bestimmung der Titer der Antiseren im ELISA

## **Titer der Antiseren**

Die Ergebnisse mit den verschiedenen Antiseren sind aus Abbildung 13 ersichtlich. Die Angabe der Titer der jeweiligen Antiseren erfolgte in Zehnerpotenzen.

Zwischen den Tieren, die mit dem gleichen Antigen immunisiert wurden, ergaben sich nur unerhebliche Unterschiede. Die **Antiseren Nr. 1 und 2** (Anti-Komplex III) zeigen den höchsten Titer, der für beide Seren bei einer Verdünnung zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  liegt. Bei Antiserum **Nr. 3 und 4** (Anti-13.4 kDa Protein) ergibt sich ein Titer zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$ . Für Antiserum **Nr. 5 und 6** (Anti-Cytochrom b) liegt dieser höher, d.h. bei einer Verdünnung von  $10^{-4}$  und etwas darüber. Während die Antiseren **Nr. 7 und 8** (Anti-6.4 kDa Protein) eine Immunreaktion bis zu einer Verdünnung zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  zeigen, reagieren die Antiseren **Nr. 9 und 10** (Anti-Cytochrom  $c_1$ ) nur in sehr niedrigen Verdünnungen, maximal bis ca.  $10^{-2}$ . Für Antiserum **Nr. 11 und 12** (Anti-Eisenschwefelprotein) ist ebenfalls ein relativ niedriger Titer zwischen  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  zu beobachten.

### **3.8 Hemmung der katalytischen Aktivität durch Antikörperbindung**

Die Untersuchung des Einflusses der Antikörper auf die katalytische Aktivität des Komplex III nach erfolgter Immunreaktion, d.h. Bildung des Immunkomplexes, wurde dadurch erschwert, daß der Komplex III nur in Anwesenheit von Detergens wasserlöslich ist. Die Vorinkubation des Komplexes mußte also in Gegenwart von Triton X-100 erfolgen, die Detergenskonzentration mußte jedoch so niedrig gehalten werden, daß die Bildung des Immunkomplexes nicht gestört wurde. Pilotexperimente zeigten, daß eine Tritonkonzen-

tration von 0.05 % diese Bedingungen erfüllte, ein geringer Aktivitätsverlust während der Vorinkubation konnte jedoch nicht vollständig vermieden werden. Die Aktivitätswerte der Meßreihen wurden deshalb um diesen Wert korrigiert.

Die Vorinkubation erfolgte in Netheler cups, 1  $\mu$ l Komplex (2  $\mu$ g Protein) wurde mit steigenden Konzentrationen an Antikörpern unter Konstanthaltung des Endvolumens im Eisbad für 10 Minuten inkubiert.

Zunächst wurde der Einfluß der verschiedenen Antiseren auf die Aktivität des Komplex III getestet. Dabei wurde festgestellt, daß lediglich Antiserum Nr. 1 und 2 (Anti-Komplex III) eine teilweise Hemmung der Enzymaktivität bewirkten, die jedoch nicht titriert werden konnte. Alle übrigen Antiseren wie auch das Kontrollserum zeigten keine Hemmung.

Besser zu bestimmen war der Einfluß der präparierten Immunglobuline IgG. Hier war auch eine Enzymhemmung mit Antikörpern aus den Seren gegen die einzelnen Untereinheiten zu beobachten. In Abbildung 14 ist die Aktivität des Komplex III gegen die zugesetzte Proteinmenge IgG aus dem Antiserum Nr. 7 (Anti-6.4 kDa Protein) aufgetragen.

Es wurde eine maximale Hemmung von 50 % erreicht, die bei Inkubation des Komplex III mit größerem IgG-Überschuß weniger stark ausgeprägt war. Ganz ähnliche Ergebnisse mit nur unterschiedlicher Ausprägung wurden mit den Antikörpern gegen die anderen Untereinheiten erzielt, weswegen auf weitere Darstellungen verzichtet wurde.

Eine vollständige Hemmung der Aktivität konnte nur mit IgG aus den Seren Nr. 1 und 2 (Anti-Komplex III) erzielt werden. Die aus Kontrollserum isolierten IgG's zeigten keinen Einfluß auf die Aktivität. In Abb. 15 ist die Auftragung der Aktivität in Abhängigkeit von der Menge der zugesetzten IgG Nr. 2 dargestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit den Antikörpern gegen die einzelnen Untereinheiten erhalten wurden, trat bei den Anti-Komplex

III IgG's auch bei sehr hohen Konzentrationen keine Aufhebung der Hemmung ein. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4 im einzelnen diskutiert.

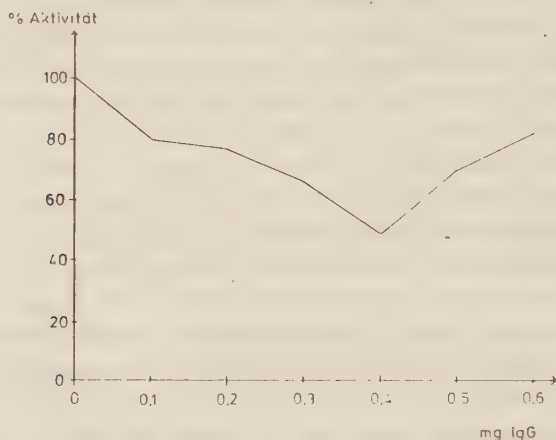


Abbildung 14: Hemmung der Aktivität des Komplex III durch IgG aus Antiserum Nr. 7 (Anti-6.4 kDa Protein)

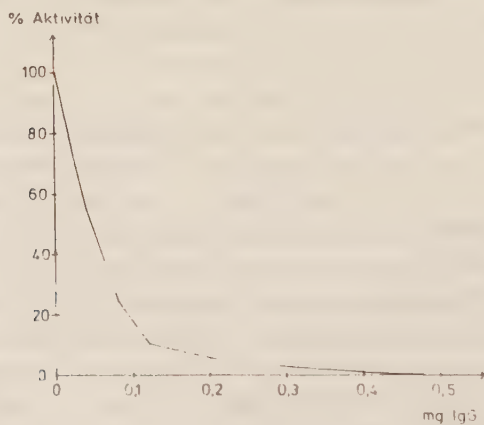


Abbildung 15: Hemmung der Aktivität des Komplex III durch IgG aus Antiserum Nr. 2 (Anti-Komplex III)

Es erhob sich die Frage, ob die Hemmung der Elektronenübertragung durch eine Hemmung der Chinonbindung an den beiden Reaktionszentren, durch eine Hemmung der Cytochrom c-Bindung am Cytochrom  $c_1$  oder durch eine Unzugänglichkeit der Reaktionszentren infolge der Bildung größerer Immunpräzipitate zustande kam.

### **3.9. Effekt der Antikörper auf die Zugänglichkeit der Chinonreaktionszentren**

Ein Einfluß der Antikörper auf die Bindung des Ubihydrochinons am Komplex III wurde durch Messung der Reduzierbarkeit der beiden Häm b Zentren kontrolliert. Eine Hemmung der Cytochrom b Reduktion trat nicht auf. Sowohl mit Anti-Komplex III Antikörper als auch mit Kontrollserum führte die Zugabe von Nonylhydrochinon zu einer vergleichbaren Reduktion des Cytochrom b. Damit ist bewiesen, daß trotz Bindung von Antikörpern die Chinonreaktionszentren frei zugänglich für ihren Reaktionspartner Nonylhydrochinon sind.

### **3.10 Effekt der Antikörper auf die Cytochrom c - Bindungsstelle**

Ein Einfluß der Antikörper auf die Zugänglichkeit der Cytochrom c -Bindungsstelle wurde durch Messung der Reduzierbarkeit des Eisenschwefelzentrums durch Ferrocyclochrom c getestet. Bei diesem von uns entwickelten Test tritt eine Umkehr der natürlichen Elektronenflußrichtung auf, d.h. Elektronen werden von reduziertem Cytochrom c (Ferrocyclochrom c) auf vorher oxidiertes Cytochrom  $c_1$  und auf das Eisenschwefelzentrum des Komplexes übertragen. Obwohl gleichzeitig eine Reduktion des Cytochrom  $c_1$  auftritt, kann diese spektral nicht verfolgt werden, da Cytochrom  $c_1$  ein

Spektrum besitzt, welches dem des Cytochrom c gleicht, d.h. in der Summenbilanz ist keine Veränderung der Absorption zu erwarten. Es ist jedoch möglich, mit Hilfe des Differenzspektrums den Anteil der Elektronen zu ermitteln, der auf das Eisenschwefelzentrum fließt. Im Differenzspektrum tritt ein "negatives" Cytochrom c Spektrum auf, das dem Anteil an reduzierten Eisenschwefelprotein entspricht.

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich ist, wurde eine Reduktion des Eisenschwefelzentrums durch zugesetztes Ferrocytochrom c durch Vorinkubation des Komplex III mit IgG aus Kontrollserum nicht beeinflusst, während die Reduktion nach Vorinkubation des Komplexes mit IgG aus Anti-Komplex III Serum vollständig gehemmt war.

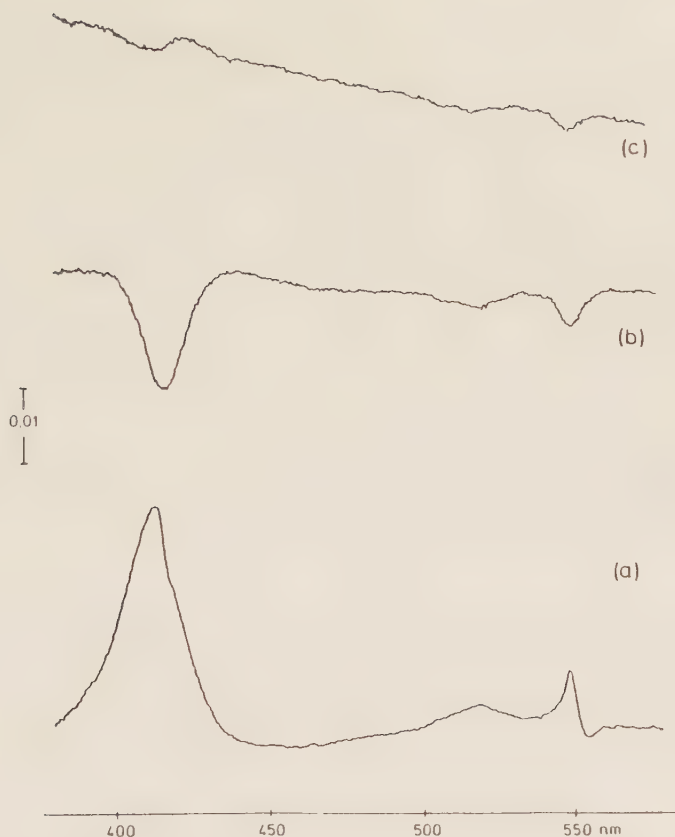


Abbildung 16: Reaktion von Ferrocytochrom c mit Komplex III

(a) Spektrum von Ferrocytochrom c ( $0.2 \mu\text{M}$ )

(b) Differenz zu Spektrum (a) nach Zugabe von Komplex III ( $0.2 \mu\text{M}$ ), vorinkubiert mit IgG aus Kontrollserum ( $100 \text{ mg/mg}$  Komplex III).

(c) Differenz zu Spektrum (a) nach Zugabe von Komplex III ( $0.2 \mu\text{M}$ ), vorinkubiert mit IgG aus Serum Nr. 2 ( $100 \text{ mg/mg}$  Komplex III).

#### 4. Diskussion

Bei den nach der vorliegenden Methode gewonnenen Immunglobulinen handelt es sich um polyklonale Antikörper. Im Gegensatz zum monoklonalen System liegt hier eine Vielzahl von Antikörpern vor, die mit verschiedenen antigenen Determinaten mit unterschiedlicher Affinität reagieren. Die als Antigen verwendeten Untereinheiten des Komplex III weisen nach der Isolierung unter Umständen einen etwas veränderten antigenen Charakter gegenüber dem nativen Zustand auf. Antikörper gegen eine isolierte Untereinheit, wie sie in den Antiseren Nr. 3 bis 12 vorliegen, können auch spezifisch gegen Areale dieser Untereinheit gerichtet sein, die normalerweise von anderen Untereinheiten des Komplex III verdeckt sind. Andererseits können möglicherweise, bedingt durch Konformationsänderungen während des Isolierungsvorganges, Antikörper gegen gewisse strukturelle Epitope der im Komplex III inkorporierten Untereinheit fehlen.

Bei der Isolierung der Immunglobuline werden durch die Affinitätschromatographie mit Protein A alle Immunglobuline der Klasse G, also auch IgG, die nicht spezifisch gegen Komplex III oder dessen Untereinheit gerichtet sind, aus dem Serum isoliert. Da aber nach Immunisierung der IgG-Gehalt in den Kaninchenserum von ca. 6 mg/ml auf ca. 8mg/ml angestiegen war, kann erwartet werden, daß der Anteil an spezifisch gegen Komplex III gerichteten Immunglobulinen mindestens 10 bis 20 Prozent beträgt.

Die Spezifität der gewonnenen Antikörper wurde im Immunoblotting überprüft. Im in Abbildung 11 dargestellten Immunoblot A ist deutlich zu erkennen, daß die Anti-Komplex III Seren Nr. 1 und 2 mit sehr vielen Proteinuntereinheiten reagieren. Das hieße, daß zumindest eine Domäne der Untereinheiten, gegen die in den Seren Nr. 1 und 2 Antikörper

enthalten sind, an der Oberfläche des Komplex III liegen sollte. Sind dagegen in diesem Test gegen bestimmte Untereinheiten, wie z.B. das 8.0 kDa oder das 9.2 kDa Protein, keine Antikörper nachweisbar, so heißt das nicht notwendigerweise, daß diese Untereinheiten nicht auch zum Teil an der Oberfläche liegen können. Ursachen für das Ausbleiben der Immunreaktion können sowohl in der Immunisierung (ungünstige antigene Determinanten) als auch beim Nachweis (unzureichende Nitrozellulosebindung beim Transfer) liegen.

Aussagen über die Topographie der einzelnen Untereinheiten des Komplex III lassen sich mit dem hier vorliegenden Ergebnis also nur in sehr beschränktem Maße treffen. Es läßt sich jedoch die bereits bekannte Tatsache bestätigen, daß die beiden Core Proteine, das Cytochrom  $c_1$ , das Eisenschwefelprotein und das 13.4 kDa Protein Domänen an der Oberfläche des Komplex III besitzen. Diesbezügliche Aussagen über die kleineren Proteinuntereinheiten dürften nicht ganz eindeutig sein, da auch Antiserum 1 und Antiserum 2 in diesem Bereich eine unterschiedliche Reaktion zeigen.

Bei den Banden zwischen dem Eisenschwefelprotein und dem 13.4 kDa Protein handelt es sich offensichtlich um Verunreinigungen oder Abbauprodukte des Komplex III, die im Gel nicht nachweisbar waren, durch die empfindlicheren immunologischen Methoden jedoch sichtbar wurden.

Zur Durchführung des Immunoblottings mussten die in der Literatur beschriebenen Systeme modifiziert werden (Towbin et al., 1979; Manabe et al., 1984; Gershoni et al., 1983; Jarasch und Kadenbach, 1982; Burnette, 1981; Vaessen et al., 1981).

Unter Verwendung der selbst angefertigten Transferkammer (Elektrodenabstand bei eingelegtem Gel ca. 1 cm) war ein Transfer von 2 Stunden bei 200 mA nötig, um auch die kleineren Proteinuntereinheiten des Komplex III in so großer Menge zu transferieren, daß diese auch mit der Silberprotein-

färbung nachweisbar waren. Gleichzeitig wurden damit, wie in Abbildung 10 sichtbar, einige größere Untereinheiten in sehr großer Menge auf Nitrozellulose transferiert. Wird nun im Immunoblot A das so erhaltene, mit viel Antigen beladene Trägermaterial mit den Antiseren inkubiert, so ist eine Adsorption von Immunglobulinen aus den Seren an Banden, die große Proteinmengen enthalten, allein durch unspezifische Proteinwechselwirkungen durchaus denkbar. Eine spezifische Immunreaktion wird also in vielen Fällen nur vorgetäuscht. Gestützt wird diese These dadurch, daß auch das Kontrollserum, das eigentlich keine Antikörper gegen Komplex III enthalten dürfte, eine positive Reaktion mit den sehr stark transferierten Banden der Core Proteine aufweist. Bei den Antiseren dürfte diese unspezifische Adsorption stärker ausgeprägt sein, da der Proteingehalt der Antiseren nach Immunisierung höher war als der des Kontrollserums. Neben dieser Adsorption hat im Immunoblot A natürlich auch die eigentlich nachzuweisende spezifische Bindung von Antikörpern stattgefunden, eine Abgrenzung von der Adsorption durch Proteinwechselwirkung ist jedoch nicht möglich.

Deswegen wurde das Immunoblotting mit der sehr kurzen Transferzeit von nur 5 Minuten bei 200 mA durchgeführt (Immunoblot B). Eine unspezifische Adsorption von Immunglobulinen dürfte dabei eher unwahrscheinlich sein, da hier nur wenig Antigen auf die Nitrozellulose transferiert wurde. Die Tatsache, daß der mit Kontrollserum inkubierte Nitrozellulosestreifen keine positive Reaktion aufweist, spricht ebenfalls dafür, so daß aus diesem Versuchsergebnis eine spezifische Antikörperbindung gefolgert werden kann. Doch kann wiederum nicht ausgeschlossen werden, daß in den Seren spezifische Antikörper enthalten sind, die in diesem Test nur nicht nachweisbar sind, da bei der sehr kurzen Transferzeit von 5 Minuten erst recht angenommen werden muß, daß gewisse Proteinuntereinheiten des Komplex III nicht in aus-

reichender Menge auf Nitrozellulose transferiert wurden. Mit Sicherheit jedoch läßt sich im Immunoblot B im Falle eines Partialsignals eine positive Aussage treffen, d.h. eine Antikörperbindung verifizieren.

Dabei stellte es sich heraus, daß nicht nur die Anti-Komplex III Seren spezifisch mit mehreren Untereinheiten des Komplex III reagierten. Auch Antiseren, die nach Immunisierung mit nur einer Untereinheit gewonnen wurden, zeigten teilweise eine Immunreaktion mit mehreren Proteinuntereinheiten. Hier dürfte es sich weniger um eine Kreuzreaktion zwischen verschiedenen Untereinheiten, als vielmehr um Verunreinigungen des zur Immunisierung verwendeten Proteins handeln. So dürfte zumindest die Reaktion der Antiseren Nr. 3 und 4 (Anti-13.4 kDa Protein) mit dem Cytochrom b erklärt werden, da das Cytochrom b erst im letzten Schritt der Isolierung von dem 13.4 kDa Proteins abgetrennt wird. Die eigentlich erwünschte Monospezifität der Antiseren gegen einzelne Untereinheiten, d.h. Immunreaktion nur mit der entsprechenden Untereinheit, konnte also nicht immer erzielt werden. Um diesem Problem in Zukunft aus dem Weg zu gehen, wäre es vielleicht empfehlenswert, als Antigene die Untereinheiten des Komplex III nicht über Säulenchromatographie, sondern mit Hilfe gelelektrophoretischer Methoden zu präparieren. Verunreinigungen mit anderen Proteinuntereinheiten würden damit ausgeschlossen, der Isolierungsvorgang selbst damit vereinfacht. Allerdings müsste die dabei auftretende Denaturierung der Proteine in Kauf genommen werden.

Die Problematik der Anwendung des Immunoblottings auf ein aus mehreren verschiedenen Untereinheiten bestehenden Proteinkomplex wie z.B. Komplex III wurde durch die unterschiedlichen Ergebnisse in Immunoblot A und B verdeutlicht.

Ein wesentlicher Unterschied des ELISA zum Immunoblotting besteht in dem verwendeten Antigen. Wurden im Immunoblotting

die einzelnen Untereinheiten des Komplex III nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließendem Transfer auf Nitrozellulose - in sicherlich unklarer Konformation - als Antigen verwendet, so wurden im ELISA alle Antiseren getestet auf Antikörper gegen die native Form des Komplex III. Damit wurden nur am Komplex III tatsächlich vorhandene antigene Determinanten erfaßt, zusätzliche oder durch Konformationsänderung bedingte Epitope einer isolierten Untereinheit blieben unberücksichtigt.

Da aber damit die Antiseren Nr. 3 bis 12 (Antiseren gegen einzelne Untereinheiten) nicht gegen die zur Immunisierung verwendeten Proteine getestet wurden, gibt der so bestimmte Titer eigentlich keine Auskunft über die Effektivität der Immunisierung beziehungsweise die Höhe der Immunantwort. Mit dieser Versuchsanordnung, die im übrigen bezüglich der Antikörperbindung genau den Bedingungen der Hemmversuche entspricht, sind aber Aussagen darüber möglich, wie groß die Affinität der einzelnen Antiseren zu Komplex III ist. Eine unspezifische Adsorption wie im Immunoblotting ist im ELISA nur bei sehr geringer Verdünnung denkbar (vgl. Kontrollserum, Verd.  $10^{-1}$ ), bei höheren Verdünnungen führt auf Grund des sehr geringen Proteingehalts nur noch die Bindung spezifischer Antikörper zu einem Farbsignal. Ergibt sich für ein Antiserum gegen eine einzelne Untereinheit ein geringer Titer, so kann das mehrere Ursachen haben. Zum Beispiel kann ein Versuchstier auf die Immunisierung schlecht reagiert haben, vor allem bei kleineren Antigenen ist eine geringe Immunantwort zu erwarten. Auch kann eine Untereinheit am isolierten Komplex III schlecht zugänglich sein. Schließlich kann eine zur Immunisierung verwendete Untereinheit durch die Isolierung eine derart veränderte Struktur aufweisen, daß die dagegen induzierten Antikörper zwar mit der isolierten Untereinheit, nicht aber mit der nativen Untereinheit an Komplex III reagieren.

Zusammenfassend läßt sich für die Antiseren Nr. 1 bis 12 folgendes feststellen:

Alle Antiseren enthalten Antikörper gegen ihre entsprechenden Antigene. Da die Antiseren Nr. 1 bis 8 (Anti-Komplex III, Anti-13.4 kDa Protein, Anti-Cytochrom b, Anti-6.4 kDa Protein) eine sehr deutliche Reaktion mit Komplex III aufweisen, lassen sich für die entsprechenden Untereinheiten Domänen an der Oberfläche des Komplex III postulieren, die auch an der zur Immunisierung eingesetzten, isolierten Untereinheit vorhanden sein müssen.

Für die Anti-Cytochrom  $c_1$  Seren Nr. 9 und 10 läßt sich vor allem im ELISA nur eine relativ schwache Reaktion mit Komplex III nachweisen. Da aber das zugehörige Antigen Cytochrom  $c_1$  relativ groß ist und zudem an der Außenseite des Komplex III lokalisiert ist, wäre eigentlich ein gegenteiliges Ergebnis zu erwarten. Mögliche Erklärungen wurden zunächst in der Methode des ELISA gesucht. Eine Ablösung des Antigens von der Mikrotiterplatte durch Antikörperbindung konnte ausgeschlossen werden, da trotz erfolgter Anti-Cytochrom  $c_1$  Bindung Komplex III mit den sehr viel stärker reagierenden Antikörper Nr. 1 und 2 nachweisbar blieb. Komplex III könnte speziell über das Cytochrom  $c_1$  an die Mikrotiterplatten gebunden, entsprechende antigene Determinanten damit unzugänglich sein. Bedenkt man aber, daß Komplex III ein Membranprotein ist, das zwei gegenüberliegende (ursprünglich aus der Membran herausragende) hydrophile Pole, ansonsten nur hydrophobe Bezirke aufweist, so ist eine gerichtete, topographisch einheitliche Adsorption an den Plattenkunststoff höchst unwahrscheinlich.

Demzufolge ist die sehr schwache Reaktion mit Komplex III nur dadurch zu erklären, daß durch die Isolierung eine relativ starke Denaturierung des Cytochrom  $c_1$  stattgefunden hat, die antigenen Determinanten also stark verändert sind. Die unterschiedliche Reaktion im ELISA und im Immunoblot B könnte dadurch erklärt werden, daß im ELISA das Antigen das

native Protein ist, während im Immunoblot nach der Elektrophorese teilweise Denaturierung eingetreten ist. Ähnlich könnte die sehr schlechte Reaktion der Antiseren Nr. 11 und 12 (Anti-Eisenschwefelprotein) mit Komplex III erklärt werden.

Die Antikörper gegen die isolierten Untereinheiten bewirken keine spezifische Hemmung der enzymatischen Aktivität des Komplex III. Die beobachtete Aktivitätsverminderung ist wahrscheinlich auf die Bildung von großen Aggregaten zurückzuführen, die nur in ihren Randbereichen für das voluminöse Substrat Cytochrom c zugänglich sind oder sogar (mit dem bloßen Auge nicht erkennbar) ausfallen. Dies wird dadurch belegt, daß die Reaktion mit dem kleinen, hydrophoben Substrat Ubichinon nicht gehemmt wird und die Hemmung bei hohen Antikörperzugaben vergleichbar der "Heidelberger Kurve" geringer wird und schließlich verschwindet. Auch läßt sich die enzymatische Aktivität in keinem Falle vollständig hemmen, da die Randbezirke der Aggregate, die je nach Verhältnis Antikörper/Komplex III unterschiedlich groß sind, in ihrer Aktivität nicht beeinträchtigt werden. Ähnlich dürften die bei Sidhu und Beattie (1982) beschriebenen Effekte im Komplex aus Hefe mit Antikörpern gegen das Core Protein II erklärt werden.

Im elektronenmikroskopischen Bild ist die Vernetzung von Proteoliposomen mit eingebautem Komplex III durch Antikörper gegen das 6.4 kDa Protein deutlich zu erkennen (Abb. 17). Damit ist gleichzeitig nachgewiesen, daß dieses Protein in den einheitlich "right-side out"-orientierten Vesikeln offensichtlich von der "cytosolischen" Außenseite der Membran zugänglich ist.

Im Gegensatz dazu bewirken die Antikörper gegen den Gesamtkomplex eine spezifische Hemmung der Bindung von Cytochrom c an den Komplex III. Die Ubihydrochinon: Cytochrom c Reduktase-Aktivität kann mit diesen Antikörpern vollständig titriert werden. Diese Hemmung nimmt auch bei hohem Anti-

körperüberschuß nicht ab; darin unterscheidet sie sich von der unspezifischen Hemmung durch Aggregation, die bei den Antikörpern gegen einzelne Untereinheiten beobachtet wurde. Die Wechselwirkung zwischen Komplex III und Cytochrom c wird spezifisch gehemmt, wie durch die fehlende Reduzierbarkeit des Eisenschwefelprotein-Cytochrom c<sub>1</sub> Segments des Komplex III durch Ferrocycytochrom c gezeigt werden konnte. Die Reaktion zwischen Komplex III und Chinonen wird nicht beeinflusst.

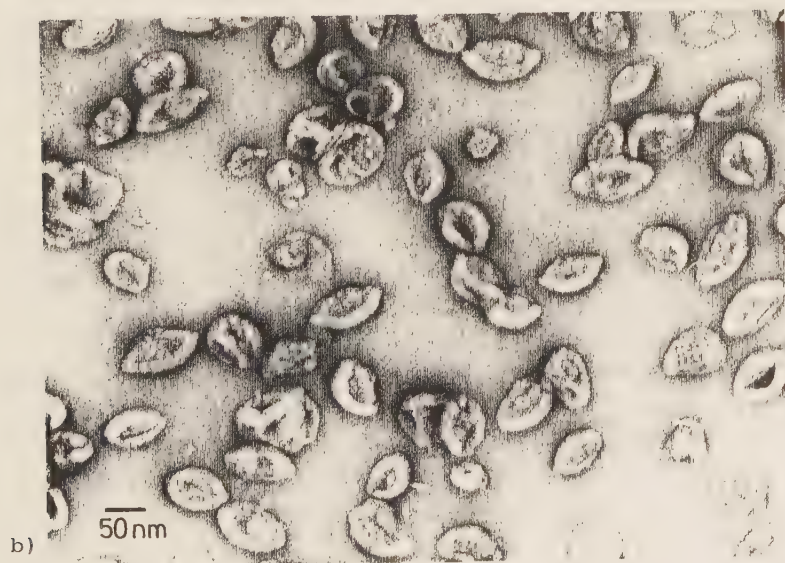
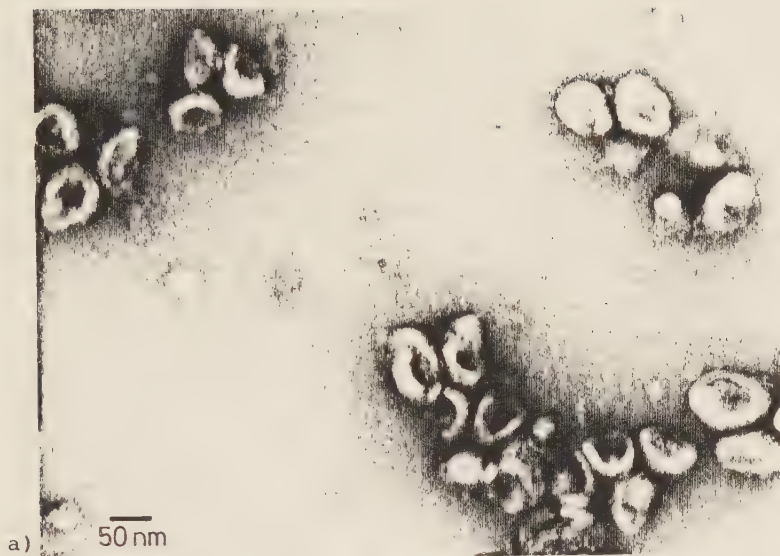
Die Antikörper gegen die einzelnen Untereinheiten hemmen also nicht spezifisch die Reaktionszentren des Komplex III, sondern reagieren mit antigenen Determinanten auf der hydrophilen Oberfläche des Komplexes. In dem Gemisch der Antikörper gegen den Gesamtkomplex sind im Gegensatz dazu Antikörper vertreten, die spezifisch das Cytochrom c Reaktionszentrum blockieren. Die Tatsache, daß die Antikörper gegen das isolierte Cytochrom c<sub>1</sub> dieses Reaktionszentrum nicht hemmen, könnte auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: Entweder sind die Oberflächendomänen des Cytochrom c<sub>1</sub> nicht oder nicht allein für die Bindung des Cytochrom c verantwortlich, oder die Konformationsunterschiede zwischen der nativen und der isolierten Form des Cytochrom c<sub>1</sub> sind so groß, daß Antikörper gegen die funktionelle Domäne nicht produziert wurden; die Ergebnisse von ELISA und Immunoblot lassen diesen Effekt zumindest für eines der beiden Cytochrom c<sub>1</sub> Antiseren (Nr. 10) erwarten. Für ersteres spricht, daß nach Wakabayashi et al. (1982) das 9.2 kDa "hinge"- (= Scharnier-) Protein an der Wechselwirkung zwischen dem Komplex III und Cytochrom c beteiligt ist. Die Tatsache, daß Antikörper gegen das 9.2 kDa Protein im Immunoblot des Gesamtserums nicht nachweisbar waren, ist insofern kein Gegenbeweis, als das 9.2 kDa Protein als kleines, relativ polares und somit hydrophiles Protein beim Elektrottransfer verloren gegangen sein könnte und die (im Gesamtserum vorhandenen) Antikörper dann nicht nachgewiesen werden könnten.

Eine Immunisierung mit dem 9.2 kDa Protein konnte nicht durchgeführt werden, da das Protein nicht in der erforderlichen Reinheit zur Verfügung stand, so daß diese Vermutung noch zu testen wäre.

**Abbildung 17:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Proteoliposomen, vernetzt mit Antikörpern gegen das 6.4 kDa Protein.

Die Proteoliposomen (Komplex III 50 µg/ml) wurden mit Antikörpern (15 mg/ml) für 10 Minuten im Eisbad inkubiert und anschließend in einer Airfuge (Beckmann Instruments) bei 100 000 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer (20 mM MOPS, 100 mM KCl, pH 7.2) wird auf eine Endkonzentration von 5 µg/ml Komplex III verdünnt. Die Proteoliposomensuspension mit gebundenen Antikörpern wurde auf mit 0.1 mg/ml Bacitracin vorbehandelter Kohlefolie gespreitet (Szoka und Papahadjopoulos, 1980) und nach Valentine et al. (1968) mit 4% Uranylformiat negativkontrastiert.

- a) Antikörper gegen das 6.4 kDa Protein
- b) Kontrolle



## 5. Zusammenfassung

Nach Isolierung von Komplex III und dessen Untereinheiten aus Rinderherzmitochondrien wurden je 2 Kaninchen gegen 6 dieser Proteine immunisiert. Dadurch induzierte Antikörper wurden aus den Seren der Tiere über eine Affinitätschromatographie mit Protein A isoliert (Immunglobuline der Klasse G). Die Techniken des Immunoblottings und des ELISA wurden für das vorliegende System standardisiert und die erhaltenen Antikörper charakterisiert.

In den Seren aller immunisierten Tiere waren Antikörper gegen die jeweils als Antigen verwendeten Proteine enthalten. Die Problematik der veränderten antigenen Eigenschaften von isolierten Untereinheiten im Vergleich zu den noch im nativen Komplex III integrierten Untereinheiten wurde vor allem an den mit Cytochrom  $c_1$  induzierten Antikörpern deutlich. Die relativ schwache Immunreaktion dieser Antikörper mit Komplex III kann durch eine während des Isolierungsvorganges abgelaufene Denaturierung des Cytochrom  $c_1$  erklärt werden.

Um die funktionelle Relevanz der Antikörper zu untersuchen, wurde ihr Einfluß auf die katalytische Aktivität des Komplex III untersucht. Dabei stellte es sich heraus, daß die Antikörper gegen einzelne Untereinheiten keine spezifische Blockade der Reaktionszentren des Komplex III bewirken. Die teilweise Hemmung des Elektronenflusses an Komplex III durch diese Antikörper wird, wie die elektronenmikroskopische Darstellung in Abbildung 17 belegt, nur durch Aggregation des Komplex III verursacht.

Mit den Antikörpern gegen den Gesamtkomplex findet in erster Linie eine spezifische Hemmung der Bindung von Cytochrom  $c$  an den Komplex III statt, wie durch Versuche mit Ferrocycytochrom  $c$  gezeigt werden konnte. Antikörper gegen das isolierte Cytochrom  $c_1$  führen dagegen nicht zur Blockade dieses Reaktionszentrums. Dies könnte durch die oben

erwähnten Konformationsunterschiede zwischen isolierter und nativer, am Komplex III integrierter Untereinheit erklärt werden. Ebenso muß eine Beteiligung mehrerer Untereinheiten an der Bildung der Cytochrom c Bindungsstelle diskutiert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Burnette, W.N. (1981) "Western Blotting: Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A", *Anal.Biochem.* **112**, 195-203
- Cantarero, L.A., Butler, J.E. und Osborne, J.W. (1980) "The Adsorptive Characteristics of Proteins for Polystyrene and their Significance in Solid-Phase Immunoassays", *Anal.Biochem.* **105**, 375-382
- Engel, W.D., (1983) "Isolierung und Charakterisierung des Komplex III der mitochondrialen Atmungskette sowie seiner Eisen-Schwefel Protein Untereinheit", Diss., LMU München
- Engel, W.D., Michalski, C. und Von Jagow, G. (1983) "Reconstitution of the Ubiquinol:Cytochrom c Reductase from a bc<sub>1</sub> Subcomplex and the 'Rieske' Iron-Sulfur Protein Isolated by a New Method", *Eur.J.Biochem.* **132**, 395-402
- Engel, W.D., Schägger, H. und Von Jagow, G. (1980) "Ubiquinol-Cytochrome c Reductase - Isolation in Triton X-100 by Hydroxyapatite and Gelchromatography", *Biochim.Biophys.Acta* **592**, 211-222
- Gershoni, J.M. und Palade, G. (1983) "Protein Blotting: Principles and Applications", *Anal.Biochem.* **131**, 1-15
- Hatefi, Y. und Galante, Y.M. (1978) "Organisation of the Mitochondrial Respiratory Chain" in "Energy Conservation in Biological Membranes", 29. Mosbacher Kolloquium (G. Schäfer und M. Klingenberg, Hrsg.), S. 19-30, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York
- Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N. und Lockau, W. (1983) "Comparative Aspects of Quinol-Cytochrome c/Plastocyanin Oxidoreductases", *Biochim.Biophys.Acta* **726**, 97-133
- Helenius, A. und Simons, K. (1972) "The Binding of Detergents to Lipophilic and Hydrophilic Proteins", *J.Biol.Chem.* **247**, 3656-3661
- Jarausch, J. und Kadenbach, B. (1982) "Tissue-Specificity Overrides Species-Specificity in Cytoplasmic Cytochrome c Oxidase Polypeptides", *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* **363**, 1133-1140

- Krämer, R. und Klingenberg, M. (1980) "Enhancement of Reconstituted ADP,ATP Exchange Activity by Phosphatidylethanolamin and by Anionic Phospholipids", *FEBS Lett.* **119**, 257-260
- Kricka, L.J., Carter, T.J.N., Burt, S.M., Kennedy, J.H., Holder, R.L., Malliday, M.I., Telford, M.E. und Wisdom, G.B. (1980) "Variability in the Adsorption Properties of Microtitre Plates Used as Solid Supports in Enzyme Immunoassay", *Clin. Chem.* **26**, 741-744
- Kröger, A. und Klingenberg, M. (1970) "Quinones and Nicotinamide Nucleotides Associates with Electron Transfer" in "Vitamins and Hormones", S. 533, Academic Press, New York
- Manabe, T., Takahashi, Y. und Okuyama, T. (1984) "An Electrophoretic Apparatus for Multiple Replica Technique and Identification of Human Serum Proteins on Micro Two-Dimensional Gels", *Anal.Biochem.* **143**, 39-45
- Mitchell, P. (1976) "Possible Molecular Mechanisms of the Protonmotive Function of Cytochrome Systems", *J.theor.Biol.* **62**, 327-367
- Moeremans, M., Daneels, G. und De Mey, J. (1985) "Sensitive Colloidal Metal (Gold or Silver) Staining of Protein Blots on Nitrocellulose Membranes", *Anal.Biochem.* **145**, 315-321
- Riccio, P., Schägger, H., Engel, W.D. und Von Jagow, G. (1977) "bc<sub>1</sub>-Complex from Beef Heart - One-Step Purification by Hydroxyapatite Chromatography in Triton X-100, Polypeptide Pattern and Respiratory Chain Characteristics", *Biochim.Biophys.Acta* **459**, 239-262
- Saraste, M. (1984) "Location of Heme-Binding Sites in the Mitochondrial Cytochrom b", *FEBS Lett.* **166**, 367-372
- Schägger, H., Link, Th.A., Engel, W.D. und Von Jagow, G. (1986) "Isolation of the Eleven Protein Subunits of the bc<sub>1</sub> Complex from Beef Heart", *Methods Enzymol.* **126**, 224-237
- Shawver, L.K., Seidel, S.L., Krieter, P.A. und Shires, Th.K. (1984) "An Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for Measuring Cytochrome b<sub>5</sub> and NADPH-Cytochrome P-450 Reductase in Rat Liver Microsomal Fractions", *Biochem.J.* **217**, 623-632
- Sidhu, A. und Beattie, D.S. (1982) "Purification and Polypeptide Characterisation of Complex III from Yeast Mitochondria", *J.Biol.Chem.* **257**, 7879-7886

- Smith, A.L. (1967) "Preparation, Properties and Conditions for Assays of Mitochondria: Slaughterhouse Material, Small-Scale", *Methods Enzymol.* **10**, 81-86
- Suissa, M. und Reid, G.A. (1983) "Preparation and Use of Antibodies against Insoluble Membrane Proteins", *Methods Enzymol.* **97**, 305-311
- Szoka, F.Jr. und Papahadjopoulos, D. (1980) "Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)", *Ann.Rev.Biophys.Bioenerg.* **9**, 467-508
- Tijssen, P. (1985) "Practice and Theorie of Enzyme Immunoassays", (R.H. Burdon und P.H. van Knippenberg, Hrsg.) S. 179, Elsevier, Amsterdam
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**, 4350-4354
- Trägler, M. (1985) "Neue Ubichinonderivate mit Alkylseitenketten unterschiedlicher Polarität und ihre Wechselwirkungen mit dem bc<sub>1</sub> Komplex der mitochondrialen Atmungskette", Diplomarbeit, LMU München
- Vaessen, R.T.M.J., Kreike, J. und Groot, G.S.P. (1981) "Protein Transfer to Nitrocellulose Filters", *FEBS Lett.* **124**, 193-196
- Valentine, R.C., Shapiro, B.M. und Stadtman, E.R. (1959) "Regulation of Glutamine Synthetase. XII. Elektron Microscopy of the Enzyme from *Escherichia coli*", *Biochemistry* **7**, 2143-2152
- Voller, A., Bidwell, D.E. und Bartlet, A. (1976) "Enzyme Immunoassay in Diagnostic Medicine", *Bull.Wld.Hlth.Org.* **53**, 55-65
- Von Jagow, G. und Engel W.D. (1980) "A Model for the Cytochrome b Dimer of the Ubiquinol: Cytochrome c Oxidoreductase as a Proton Translocator", *FEBS Lett.* **111**, 1-5
- Von Jagow, G. und Link, Th.A. (1984) "The Redox Behaviour of Mammalian Ubiquinone" in "Biochemical and Clinical Aspects of Coenzyme Q", (K. Folkers und Y. Yamamura, Hrsg.), S. 87-98, Elsevier, Amsterdam
- Von Jagow, G., Link, Th.A., Schägger, H. und Ohnishi, T. (1985) "Ubiquinol: Cytochrome c Reductase, an Osmoenzyme Consisting of Eleven Subunits, Transferring Electrons and Conducting Hydrogen" in "Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research", (E. Quagliariello et al., Hrsg.) S. 115-126, Elsevier, Amsterdam

- Von Jagow, G., Schägger, H., Riccio, P., Klingenberg, M. und Kolb, H.J. (1977) "bc<sub>1</sub> Complex from Beef Heart: Hydrodynamic Properties of the Complex Prepared by a Refined Hydroxyapatite Chromatography in Triton X-100", *Biochim.Biophys.Acta* **462**, 549-558
- Wakabayashi, S., Takeda, H., Matsubara, H., King, C.H. und King, T.E. (1982) "Identity of the Heme-Not-Containing Protein in Bovine Heart Cytochrome c<sub>1</sub> Preparation with the Protein Mediating c-c<sub>1</sub> Complex Formation - A Protein with High Glutamic Acid Content", *J.Biochem.* **91**, 2077-2085
- Wells, M.A. und Hanahan, D.J. (1969) "Phospholipase A from *Crotalus adamanteus* Venom", *Methods Enzymol.* **14**, 178-184
- Wharton, D.C. und Tzagoloff, A. (1967) "Cytochrome Oxidase from Beef Heart Mitochondria", *Methods Enzymol.* **10**, 245-250
- Widger, W.R., Cramer, W.A., Herrmann, R. und Trebst, A. (1984) "Sequence Homology and Structural Similarity between Cytochrome b of Mitochondrial Complex III and the Chloroplast b<sub>6</sub>-f Complex: Position of the Cytochrome b Hemes in the Membrane", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **81**, 674-678
- Wikström, M., Krab, K. und Saraste, M. (1981) "Proton-Translocating Cytochrome Complexes", *Ann.Rev.Biochem.* **50**, 623-655
- Yu, C.A., Nagaoka, S., Yu, L. and King, T.E. (1978) "Evidence for the Existence of a Ubiquinone Protein and its Radical in the Cytochromes b and c<sub>1</sub> Region in the Mitochondrial Electron Transport Chain", *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **82**, 1070-1078

## 7. Abkürzungen

|                 |                                                 |
|-----------------|-------------------------------------------------|
| QH <sub>2</sub> | Ubihydrochinon                                  |
| EGTA            | Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure |
| EDTA            | Ethylendiamin-tetraessigsäure                   |
| Tris            | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                |
| PMSF            | Phenylmethansulfonylfluorid                     |
| MOPS            | 3-Morpholino-propansulfonsäure                  |
| SDS             | Natriumlaurylsulfat                             |
| TEMED           | N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin             |
| Ag              | Antigen                                         |
| Ak              | Antikörper                                      |

## Lebenslauf

Am 20. September 1961 wurde ich als Sohn von Josef Steer und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Wackerbauer in Höhenberg, Landkreis Landshut geboren.

Von 1967 bis 1971 besuchte ich die Volksschule in Geisenhausen, anschließend das Gymnasium Gars am Inn, wo ich 1980 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1980 bis 1985 studierte ich Zahnheilkunde an der Ludwig Maximilians-Universität in München und legte dort im November 1985 die zahnärztliche Prüfung ab.





